

**UJI ANTIOKSIDAN FRAKSI n-HEKSANA, KLOOROFORM dan n-BUTANOL *Hydrilla verticillata* HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL dari PERAIRAN DANAU RANU PASURUAN**

**SKRIPSI**

**Oleh  
MOCHAMAD NICO ADITYA YUDIAWAN  
NIM. 14630022**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2020**

**UJI ANTIOKSIDAN FRAKSI n-HEKSANA, KLOOROFORM dan n-BUTANOL *Hydrilla verticillata* HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL dari PERAIRAN DANAU RANU PASURUAN**

**SKRIPSI**

**Oleh  
MOCHAMAD NICO ADITYA YUDIAWAN  
NIM. 14630022**

**Diajukan Kepada:  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang  
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si.)**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2020**

**UJI ANTIOKSIDAN FRAKSI n-HEKSANA, KLOOROFORM dan n-BUTANOL *Hydrilla verticillata* HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL dari PERAIRAN DANAU RANU PASURUAN**

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**MOCHAMAD NICO ADITYA YUDIAWAN**

**NIM. 14630022**

**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji Oleh:**

**Pembimbing I**

**: A. Ghanaim Fasya, M.Si**

**NIP. 19820616 200604 1 002**



**Pembimbing II**

**: Ahmad Hanapi, S.Si., M.Sc**

**NIDN. 19851225201608011069**



Mengetahui,

Ketua Jurusan Kima



Elok Kamilah Hayati, M. Si

NIP. 19790620 200604 2 002

**UJI ANTIOKSIDAN FRAKSI n-HEKSANA, KLOOROFORM dan n-BUTANOL *Hydrilla verticillata* HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL dari PERAIRAN DANAU RANU PASURUAN**

**SKRIPSI**


**Oleh:**  
**MOCHAMAD NICO ADITYA YUDIAWAN**  
**NIM. 14630022**

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 26 Desember 2020

Penguji Utama	: Elok Kamilah Hayati, M.Si NIP. 19790620 200604 2 002
Ketua Penguji	: Rachmawati Ningsih, M. Si NIP. 198108111200801210
Sekretaris Penguji	: A. Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002
Anggota Penguji 1	: Ahmad Hanapi, S.Si., M.Sc NIDN. 19851225201608011069



Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia



Elok Kamilah Hayati, M. Si  
NIP. 19790620 200604 2 002

## PERNYATAAN ORISINALITAS TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Mochamad Nico Aditya Yudiawan  
NIM : 14630022  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Penelitian : “Uji Antioksidan Fraksi n-Heksana, Kloroform dan n-Butanol *Hydrilla verticillata* Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Dari Perairan Danau Ranu Pasuruan”

menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila pada kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 26 Desember 2020

Yang membuat pernyataan,



Mochamad Nico Aditya Yudiawan  
NIM. 14630022

## KATA PENGANTAR



Segala puji bagi Allah SWT karena atas rahmat, taufiq dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan laporan hasil penelitian yang berjudul **“Uji antioksidan fraksi n-heksana, kloroform dan n-butanol *Hydrilla verticillata* hasil hidrolisis ekstrak metanol dari perairan danau ranu Pasuruan”**. Sholawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada Nabi besar Muhammad SAW yang menjadi suri tauladan bagi kita semua. Penulis menyadari bahwa penyusunan laporan hasil penelitian ini tidak akan terwujud tanpa adanya bantuan dan dorongan dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua yang telah memberikan dukungan baik spiritual maupun materiil.
2. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si, Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si selaku dosen pembimbing dan konsultan, karena atas bimbingan dan pengarahan yang diberikan, penulisan laporan hasil penelitian ini dapat terselesaikan.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si, selaku Ketua Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Seluruh Dosen pengajar kimia yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat bagi penulis.
5. Seluruh Laboran dan Staff Administrasi Jurusan Kimia yang telah membantu dalam proses penelitian.
6. Teman-teman mahasiswa angkatan 2014 terutama *Hydrilla Team* yang telah banyak membantu penulis dan memberikan dukungan dalam menyusun laporan hasil penelitian.
7. Semua pihak yang telah membantu.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan laporan hasil penelitian ini baik dalam teknik penyajian materi maupun pembahasan. Demi kesempurnaan proposal penelitian ini, saran dan kritik yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Semoga laporan hasil penelitian ini bermanfaat dan dapat menambah ilmu pengetahuan bagi para pembaca.

Malang, November 2020

Penulis

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS .....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	ix
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
ABSTRAK. ....	xii

### BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Batasan Masalah.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5

### BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tumbuhan dalam Al-Qur'an .....	6
2.2 <i>Hydrilla verticillata</i> .....	7
2.3 Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif <i>Hydrilla Verticillata</i> .....	8
2.3.1 Ekstraksi Senyawa Aktif .....	8
2.3.2 Hidrolisis dan Partisi.....	9
2.3.3 Uji Fitokimia.....	10
2.3.4 Senyawa Steroid .....	10
2.3.5 Flavonoid .....	10
2.3.6 Alkaloid .....	11
2.4 Uji Antioksidan dengan menggunakan metode DPPH. ....	12
2.5 Identifikasi Menggunakan spektrofotometer UV-Vis .....	13

### **BAB III METODOLOGI**

3.1	Waktu dan Tempat Penelitian.....	14
3.2	Alat dan Bahan. ....	14
3.2.1	Alat-alat Penelitian .....	14
3.2.2	Bahan .....	14
3.3	Rancangan penelitian.....	15
3.4	Tahapan penelitian.....	16
3.5	Pelaksanaan penelitian.....	16
3.5.1	Preparasi Sampel (biomassa <i>Hydrilla verticillata</i> ).....	16
3.5.2	Analisis Kadar Air Biomassa <i>Hydrilla verticillata</i> . ....	16
3.5.3	Ekstraksi Komponen Aktif. ....	17
3.5.4	Hidrolisis Ekstrak Metanol <i>Hydrilla verticillata</i> .....	18
3.5.5	Partisi Ekstrak metanol <i>Hydrilla verticillata</i> .....	18
3.5.6	Uji antioksidan dengan metode DPPH.. ....	19
3.5.6.1.	A .....	19
3.5.6.2.	B .....	19
3.5.6.3.	C .....	19
3.5.7	Uji Fitokimia .....	20
3.5.7.1	Uji Flavonoid.....	21
3.5.7.2	Uji Alkaloid .....	21
3.5.7.3	Uji Saponin. ....	21
3.5.7.4	Uji Triterpenoid dan Steroid. ....	21
3.5.7.5	Uji Tanin.....	22
3.5.8	Identifikasi dengan UV-Vis.....	22
3.6	Analisa data .....	22

### **BAB IV PEMBAHASAN**

4.1	Preparasi Sampel <i>Hydrilla verticillata</i> .....	23
4.2	Analisis Kadar Air <i>Hydrilla verticillata</i> . ....	24
4.3	Ekstraksi Komponen Aktif. ....	24
4.4	Hidrolisis Ekstrak Metanol <i>Hydrilla verticillata</i> . ....	25
4.5	Partisi Ekstrak Metanol <i>Hydrilla verticillata</i> .....	27



4.6	Uji fitokimia dengan reagen .	29
4.7	Uji Alkaloid	30
4.8	Uji Saponin	31
4.9	Uji Triterpenoid/Steroid	32
4.10	Uji Tanin	33
4.11	Pemanfaatan <i>Hydrilla verticillata</i> dalam Prespektif Islam	34
4.12	Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH	35
4.13	Pengukuran Aktivitas Antioksidan Pada Sampel	36
4.14	Pemanfaatan <i>Hydrilla verticillata</i> dalam Perspektfi Islam	38

## **BAB V PENUTUP**

5.1	Kesimpulan.	41
5.2	Saran.	41

<b>DAFTAR PUSTAKA.</b>	<b>42</b>
------------------------	-----------

<b>LAMPIRAN.</b>	<b>48</b>
------------------	-----------

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Dasar Senyawa Flavonoid.....	11
Gambar 2.2 Reaksi Radikal Bebas DPPH dengan Antioksidan .....	12
Gambar 4.1 Reaksi Hidrolisis gugus O – Glikosida .....	27
Gambar 4.2 Dugaan Reaksi Alkaloid dengan Mayer .....	31
Gambar 4.3 Dugaan Reaksi Triterpenoid/Steorid dengan Lieberman-Burchard.....	32
Gambar 4.4 Dugaan Reaksi Tanin dengan Gelatin.....	34
Gambar 4.5 Spektra Uv-Visible Dugaan Senyawa Metabolit Sekunder.....	35
Gambar 4.6 Spektra Uv-Visible DPPH.....	35

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Rendemen Hasil Partisi.....	29
Tabel 4.2 Hasil Uji Fitokimia Masing-masing Ekstrak .....	30
Tabel 4.3 Hasil Pengukuran Aktivitas Antioksidan Pada Sampel .....	37

## DAFTAR LAMPIRAN

1. Rancangan Penelitian.....	48
2. Preparasi Sampel.....	49
3. Analisa Kadar Air.....	49
4. Ekstraksi Senyawa Aktif.....	50
5. Uji Fitokimia.....	51
6. Hidrolisis Ekstrak <i>Hydrilla verticillata</i> .....	54
7. Partisi Ekstrak Metanol <i>Hydrilla verticillata</i> .....	55
8. Uji Aktivitas Antioksidan .....	56
9. Pembuatan Larutan .....	57
10. Data Pengamatan dan Perhitungan .....	64
11. Nilai EC <sub>50</sub> .....	66

## ABSTRAK

Yudiawan, M. N. A. 2020. **Uji Antioksidan Fraksi n-Heksana, Kloroform dan n-Butanol Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata***. Proposal. Pembimbing utama : A. Ghanaim Fasya, M.Si; Konsultan: Rachmawati Ningsih, M. Si.

**Kata Kunci :** *Hydrilla verticillata*, antioksidan, Brine Shrimp Lethal Test, steroid, UV-VIS

---

*Hydrilla verticillata* mengandung senyawa aktif yang merupakan senyawa metabolit sekunder. Manfaat yang terdapat pada hydrilla antara lain sebagai antimikroba, antimalaria dan sitotoksik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat aktivitas antioksidan dan mengetahui hasil identifikasi antioksidan yang paling tinggi pada fraksi n-heksana; kloroform; dan n-butanol hasil hidrolisis ekstrak metanol hydrilla *verticillata* serta uji terhadap DPPH menggunakan instrument UV-VIS.

Tahapan penelitian meliputi tumbuhan hydrilla diekstrak dengan methanol kemudian dimaserasi menggunakan pelarut metanol p.a. Ekstrak metanol dihidrolisis dengan larutan HCl 2 N kemudian dipartisi tidak bertingkat dengan variasi pelarut yaitu n-heksana, kloroform dan n-butanol. Uji aktivasi antioksidan menggunakan DPPH dan uji kandungan golongan senyawa aktif dilanjutkan dengan identifikasi senyawa aktif menggunakan UV-VIS.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi n-butanol memiliki nilai  $EC_{50}$  yang tinggi terhadap sampel hydrilla yang digunakan, yaitu memiliki nilai 510.2 ppm, uji fitokimia pada ekstrak metanol menunjukkan adanya alkaloid, saponin, triterpenoid dan steroid, fraksi kloroform mengandung alkaloid, saponin, triterpenoid dan steroid, fraksi kloroform mengandung alkaloid, saponin, triterpenoid dan steroid, sedangkan untuk fraksi n-butanol mengandung alkaloid, saponin, steroid dan tanin.

## ABSTRACT

Yudiawan, M. N. A. 2020. **Antioxidant Test of n-Hexane, Chloroform and n-Butanol Fraction from Hydrolysis of Methanol Hydrilla verticillata Extract**. Proposal. Supervisor : A. Ghanaim Fasya, M.Si. Consultant : Rachmawati Ningsih, M. Si.

**Keywords** : Hydrilla verticillata, toxicity, Brine Shrimp Lethal Test, steroids, UV-VIS

---

Hydrilla verticillata contains active compounds which are secondary metabolites. The benefits found in hydrilla include antimicrobials, antimalarials and cytotoxics. This study aims to determine the level of toxicity of the n-hexane fraction; chloroform and n-butanol hydrolysis of methanol extract of hydrilla verticillata and test of DPPH using UV-VIS.

Stages of research involve hydrilla plant is extracted by maceration method using methanol solvent p.a. Methanol extract was hydrolyzed with 2 N HCl solution then partitioned non-level with variations of solvents namely n-hexane, chloroform and n-butanol. The antioxidant activation test uses DPPH and the test of the active compound class is followed by identification of active compounds using UV-VIS.

The results showed that the n-hexane fraction had the highest toxicity to shrimp larvae *Artemia salina* Leach which had the lowest EC<sub>50</sub> value. The EC<sub>50</sub> values of each fraction were: n-hexane fraction (30.8615 ppm), chloroform fraction (34.6766 ppm), and n-butanol fraction (39.1573 ppm). Phytochemical test on methanol extract showed the presence of alkaloids, saponins, steroids and tannins. The n-hexane fraction showed the presence of saponins and steroids, chloroform fraction contained alkaloids, saponins, triterpenoids and steroids, whereas for the n-butanol fraction contained alkaloids, saponins, steroids and tannins. The results of steroid testing of n-hexane fraction with LC-MS / MS obtained were 397, 383, 395, 369, and 369 indicating the presence of  $\beta$ -sitosterol, campesterol, stigmasterol, fukosterol and cholesterol steroids.

## مستخلص البحث

يودياوان، م. ن. ا. ٢٠٢٠ اختبار السمية لمركبات الستيرويد n-الهكسان ، الكلوروفورم و n-بيوتانول *Hydrilla verticillata* جزء من التحلل المائي ناتج من مستخلص الميثانول من بحيرة رانو باسوروان. المشرفة الأولى: أ. غنائم فشي، الماجستير، المشرف الثاني: احمد ابطخي، الماجستير، مستشار: رحمتي نيغسيه، الماجستير

الكلمات الرئيسية: *Hydrilla verticillata* ، سمية، اختبار مريب الروبيان المميت ، المنشطات،

LC-MS / MS

*Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle هي قبيلة Hydrocharitaceae منتشرة على نطاق واسع في بحيرة Ranu. وتشمل الفوائد الموجودة في هيدريلا مضادات الميكروبات ومضادات الملاريا والتسمم الخلوي. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد مستوى سمية جزء هكسان n ؛ الكلوروفورم ون-بيوتانول ومعرفة فئة من المركبات النشطة التي لديها أعلى السمية لأرتيميا سالينا ليتش.

يتم استخلاص نبات هيدريلا بطريقة التذرية باستخدام مذيب الميثانول p.a . تم تحليل مستخلص

الميثانول بمحلول HCl 2 N ثم غير مقسم غير مستوي مع اختلافات في المذيبات وهي n-الهكسان و الكلوروفورم و n-بيوتانول . تم اختبار كل من الكسور للسمية باستخدام طريقة اختبار الميلان الروبيان المميت بقيمة معلمة من LC<sub>50</sub>. تم إجراء تحديد للمركبات النشطة بواسطة اختبار كيميائي نباتي متبوعًا بالتحرف

باستخدام LC-MS / MS

أوضحت النتائج أن الجزء n-الهكسان كان أعلى سمية ليرقات الروبيان *Artemia salina* Leach التي كانت أقل قيمة LC<sub>50</sub>. كانت قيم LC<sub>50</sub> لكل جزء هي: جزء n-الهكسان (30.8615 ppm) ، و جزء الكلوروفورم (34.6766 ppm)، و جزء n-بيوتانول (39.1573 ppm) وأظهر الاختبار الكيميائي على مستخلص الميثانول وجود القلويدات ، والصابونين ، والمنشطات والتانينات. أظهر جزء n-الهكسان وجود صابونين و الستيرويد ، يحتوي جزء الكلوروفورم على قلويدات و صابونين و triterpenoids وستيرويدات ، بينما بالنسبة لجزء n-بيوتانول يحتوي على قلويدات و صابونين و الستيرويد و tannins. كانت نتائج اختبار الستيرويد لكسر n-هكسان مع LC-MS / MS التي تم الحصول عليها 397 و 383 و 395 و 369 و 369 مما يدل على وجود  $\beta$ -sitosterol و campesterol و stigmasterol و fukosterol وستيرويدات الكوليسترول.

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Seiring dengan bertambahnya jumlah populasi penduduk di dunia serta transportasi dan industri semakin bertambah pesat, sehingga dampak pencemaran dan terhadap lingkungan juga semakin meluas yang dapat menyebabkan sistem peratahanan tubuh yang dapat menurun, sehingga bisa menjadi peningkatan jumlah radikal bebas yang dapat mengganggu kesehatan tubuh tersebut. Radikal bebas sangat berbahaya bagi tubuh. Radikal bebas merupakan suatu molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan dalam orbital terluarnya sehingga sangat reaktif. Jumlah radikal bebas dapat mengalami peningkatan yang diakibatkan faktor stress, radiasi, asap rokok dan polusi lingkungan yang menyebabkan sistem pertahanan tubuh yang ada tidak memadai. Sehingga dibutuhkan antioksidan yang dapat melindungi tubuh dari serangan radikal bebas.

Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih (elektron donor) kepada radikal bebas, sehingga reaksi radikal bebas tersebut dapat terhambat. Senyawa ini memiliki berat molekul yang kecil, tetapi mampu mengaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan alami selain dapat melindungi tubuh dari serangan radikal bebas juga mampu memperlambat terjadinya penyakit kronik yang disebabkan penurunan spesies oksigen reaktif (ROS) terutama radikal hidroksil dan radikal superoksida. Antioksidan alami juga berfungsi menghambat



oksidasi lipid yang menyebabkan ketengikan dan kerusakan pada makanan (Halliwell & Gutteridge, 1999; Rohdiana, 2001).

*Hydrilla verticillata* diketahui mengandung senyawa aktif yang merupakan senyawa metabolit sekunder. Hafiz, dkk., (2017) dalam penelitiannya menyatakan bahwa ekstrak metanol *hydrilla verticillata* positif terhadap uji steroid, alkaloid, flavonoid, saponin, triterpenoid dan tannin (gelatin). Ekstrak kloroform dan n-heksana *hydrilla verticillata* juga mengandung senyawa aktif triterpenoid dan steroid. Sebagaimana firman Allah SWT pada QS An-Nahl ; 11.

يُنْبِتُ لَكُمْ بِهِ الزَّرْعَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ وَمِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ

Artinya: Dia menumbuhkan bagi kamu dengan air hujan itu tanam-tanaman; zaitun, korma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar benar ada tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang memikirkan. (Qs An-Nahl ayat:11). Ungkapan ini mengisyaratkan kepada kita untuk merespon ciptaan Allah SWT. Bahwasannya Allah SWT memperlihatkan kepada kita tanda kekuasaan Allah dengan berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang di dalamnya banyak sekali kandungan kesehatan yang baik untuk kita, di antara dari tumbuhan itu adalah tanaman *hydrilla verticilla* yang mengandung senyawa steroid.

Ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol merupakan metode yang digunakan untuk mengekstrak senyawa aktif *hydrilla verticillata*. Dilakukan ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol karena metanol lebih efisiensi untuk penetrasi ke dalam dinding sel, sehingga dapat menghasilkan metabolit sekunder

lebih banyak (Bariyyah, dkk.,2013). Sementara Nurjanah, dkk., (2012) dalam penelitiannya juga menyebutkan bahwa ekstrak metanol semanggi air (11,98%) menghasilkan rendemen yang lebih banyak dibandingkan ekstrak kloroform (0,31%) dan etil asetat (1,37%).

Metabolit sekunder berupa steroid dapat memberikan aktivitas antioksidan yang tinggi. Hal ini berdasarkan penelitian krisna (2014) yang menunjukkan isolat steroid dari ekstrak daun gayam bersifat antioksidan terhadap difenilprikil hidrazil (DPPH) dengan nilai  $LC_{50}$  sebesar 4 ppm. Menurut penelitian Rahmawati (2016) uji aktivitas antioksidan isolat steroid dari mikroalga *chlorella sp.* Memiliki nilai aktivitas  $EC_{50}$  sebesar 152,3 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa isolat steroid lebih kuat aktivitas antioksidannya dari pada fraksi. Pemisahan senyawa metabolit sekunder yang lebih spesifik dalam penelitian ini dilakukan dengan cara hidrolisis menggunakan HCl 2N dan partisi dengan pelarut n-heksana, kloroform, dan n-butanol. Pemilihan pelarut tersebut untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder berdasarkan kepolarannya. Senyawa non polar akan terekstrak dalam pelarut n-heksana, senyawa semipolar akan terekstrak dalam pelarut kloroform dan senyawa polar akan terekstrak dalam pelarut n-butanol. Desianti (2014) pada penelitiannya menggunakan metode hidrolisis dan partisi menyebutkan bahwa fraksi n-heksana memiliki randemen yang lebih banyak sebesar (32,7809%) dan memiliki nilai  $LC_{50}$  lebih rendah (34,2133 ppm) dibandingkan ekstrak sebelum hidrolisis (38,9697 ppm). Afif (2015) dalam penelitiannya menggunakan metode dihidrolisis dengan HCl 2N sebagai katalis terhadap alga merah *E. cottoni* menyebutkan bahwa fraksi kloroform memiliki randemen yang lebih banyak sebesar (16,98%) dan ekstrak setelah dihidrolisis dan partisi memiliki nilai LC 50

lebih rendah untuk fraksi 1-butanol (70,32ppm) dibandingkan ekstrak sebelum dihidrolisis (194,40 ppm).

Metode pengujian aktivitas antioksidan *hydrilla verticillata* dari fraksi pelarut n- heksan, kloroform, dan n- butanol adalah DPPH. Pengujian metode DPPH ini dilakukan untuk mengetahui nilai EC<sub>50</sub> (effective concentration), yang merupakan parameter yang menunjukkan konsentrasi ekstrak uji yang mampu meredam radikal sebanyak 50%. Keunggulan dari metode DPPH adalah dapat dikerjakan secara cepat, diperoleh hasil yang akurat, efisien, dan mudah dalam preparasi sampel (Pamarti, 2005). Isolat senyawa yang memiliki sifat antioksidan paling tinggi akan di analisis menggunakan UV-Vis, hasil dari penelitian yang diperoleh diharapkan dapat memberi pengetahuan tentang *hydrilla verticillata* yang memiliki tingkat antioksidan yang tinggi yang mampu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas.

## 1.2 Rumusan masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana tingkat aktivitas antioksidan fraksi n-heksana, kloroform, dan, n-butanol hasil hidrolisis ekstrak metanol *hydrilla verticillata* terhadap DPPH ?
2. Bagaimana hasil identifikasi isolat senyawa aktif antioksidan pada fraksi n-heksan, kloroform, dan, n-butanol hasil hidrolisis ekstrak metanol *hydrilla verticillata* menggunakan instrumentasi UV-Vis ?

### 1.3 Tujuan penelitian

Tujuan penelitian pada penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui tingkat aktivitas antioksidan pada fraksi n-heksan, kloroform, dan n-butanol hasil hidrolisis ekstrak metanol *hydrilla verticillata*
2. Untuk mengetahui hasil identifikasi antioksidan yang paling tinggi pada fraksi n-heksana, kloroform, dan ,n-butanol hasil hidrolisis ekstrak metanol *hydrilla verticillata* terhadap DPPH menggunakan instrumentasi UV-Vis

### 1.4 Batasan masalah

Batasan masalah yang diambil yaitu:

1. Sampel yang digunakan berasal dari Danau Ranu Kabupaten Pasuruan
2. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode ekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut metanol p.a
3. Uji antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH dengan menghitung nilai EC50
4. Identifikasi senyawa aktif menggunakan instrument UV-Vis

### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat mengenai potensi antioksidan isolate steroid *hydrilla verticilata* sehingga dapat di manfaatkan di bidang farmakolgi.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tumbuhan dalam Al-qur'an

Banyak sekali nilai manfaat yang didapatkan oleh manusia dari tumbuh-tumbuhan, namun terkadang banyak tumbuh-tumbuhan yang berada di sekitar kita belum diketahui manfaatnya. Keberadaan tumbuh – tumbuhan merupakan berkah dan rahmat Allah Swt yang di berikan kepada seluruh makhluknya. Allah Swt berfirman:

وَعِنَبًا وَقَضْبًا (28) وَزَيْتُونًا وَنَخْلًا (29) وَحَدَائِقَ غُلْبًا (30) وَفَاكِهَةً وَأَبًّا (31) مَتَاعًا لَّكُمْ وَلِأَنْعَامِكُمْ (32)

*Artinya: "lalu kami tumbuhkan biji-bijian di bumi itu, 28.anggur dan sayur-sayuran, 29) zaitun dan Kurma, 30). Kebun-kebun yang lebat, 31) dan buah- buahan serta rumput-rumputan, 32) untuk kesenanganmu dan binatang ternakmu" (QS. 'Abasa (80):27-32).*

Ayat diatas menjelaskan tentang kuasa Allah Swt menciptakan biji-bijian, sayur-sayuran, buah-buahan serta rumput yang bisa jadi bahan makanan bagi manusia dan ternak. Setiap unsur tumbuhan ini memiliki khasiat bagi tubuh manusia yang bisa di teliti dalam kehidupan kita, dan banyak hal dari unsur – unsur ini yang dapat dipelajari untuk mencerahkan dan memberikan pandangan mendalam akan keajaiban yang terkandung di dalam unsur tersebut.

## 2.2 *Hydrilla Verticillata*

*Hydrilla verticillata* yang digunakan dalam penelitian ini merupakan *hydrilla verticilata* dari danau ranu grati pasuruan. *Hydrilla verticilata* tumbuhan air yang merupakan bagian dari ekosistem danau dan berperan sebagai sumber daya baik langsung maupun tidak langsung (Tanor, 2004). Tumbuhan air adalah tumbuhan yang tumbuh di air atau sebagian siklus hidupnya berada di air. Keberadaan tumbuhan air di perairan terbuka tidak selalu menimbulkan kerugian. Menurut Silalahi (2010) *Hydrilla verticillata* memiliki ciri-ciri yaitu, daun berukuran kecil berbentuk lanset yang tersusun mengelilingi batang. Batangnya bercabang dan tumbuh mendatar sebagai stolon yang pada tempat tertentu membentuk akar serabut. Tumbuhan ini merupakan tumbuhan yang seluruh bagian tubuhnya tenggelam di bawah permukaan air. Perkembang biakan *Hydrilla verticillata* terjadi dengan pesat dengan adanya stolon. *Hydrilla verticillata* merupakan vegetasi akuatik yang mendominasi di perairan Danau Toba. Menurut Steenis dan Kruseman (1957) klasifikasi dari *Hydrilla verticillata* adalah:

Kingdom	: Plantae,
Super Divisi	: Spermatophyta,
Divisi	: Magnoliophyta,
Kelas	: Liliopsida,
Ordo	: Hydrocharitales, Famili : Hydrocharitacea,
Genus	: Hydrilla,
Spesies	: Hydrilla verticillata (L. f.) Royle

Kandungan nutrisi pada *hydrilla verticillata* yang tinggi adalah saponin,  $\beta$ -karoten, polisakarida, sama amino, mikro dan makronutrien, antioksidan dan agen detoksifikasi (Pal dan Nimse, 2006). Kandungan klorofilnya sebesar 4,43 mg/L, karoteneid 0,92 mg/L dan vitamin C 4,70 mg/ 30 g (Kurniawan, 2010). *Hydrilla verticillata* memiliki aktivitas antibakteri, anitoksidan dan antitumor sehingga dapat mendukung system kekebalan tubuh (Ramesh, Rajan & Sathanam, 2014). Secara medis tumbuhan ini dapat membantu meningkatkan system kekebalan tubuh, menurunkan berat badan , menguatkan tulang, memelihara kesehatan kulit dan memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri serta antitumor (Ramesh, dkk, 2014).

## **2.3 Identifikasi Senyawa Aktif *Hydrilla Verticillata***

### **2.3.1 Ekstraksi Senyawa Aktif *Hydrilla Verticillata***

Ekstraksi merupakan proses penarikan kandungan senyawa metabolit sekunder yang berasal dari sampel atau bahan asal dengan menggunakan pelarut (syamsuni, 2006). Sehingga didapatkan hasil berupa ekstrak (Ditjen POM, 1986). Prinsip ekstraksi adalah melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa non polar dalam pelarut non polar (*like dissolve like*). Faktor yang mempengaruhi proses ekstraksi adalah pemilihan pelarut dan metode ekstraksi, meliputi lama ekstraksi, suhu, lama pengadukan, proses panyairan dan pemekatan. Hal yang harus di perhatikan dalam pemilihan jenis pelarut adalah daya melarutkan, titik didih, sifat toksik, mudah tidaknya terbakar dan sifat korosif terhadap peralatan ekstraksi (khopkar, 2008).

Maserasi di dasarkan pada perendaman sampel dengan pelarutnya pada suhu ruang. Metode maserasi dapat menggunakan beberapa pelarut, diantaranya adalah air, etanol, metanol, etanol-air atau sejenisnya (Ditjen POM.2000). Metode ini tergolong metode yang mudah dilakukan karena alat yang diperlukan cukup sederhana dan minim terjadi kerusakan pada komponen kimia. Namun metode ini membutuhkan waktu yang cukup lama dan hasil ekstraksinya kurang sempurna (Ditjen POM, 1986). Pelarut yang digunakan adalah pelarut yang dapat mencari sebagian besar meatabolit sekunder yang di- inginkan dalam simplisia (Anonim, 2008). Metanol merupakan pelarut yang bersifat universal sehingga dapat melarutkan analit yang bersifat polar dan nonpolar. Metanol dapat menarik alkaloid, steroid, saponin, dan flavonoid (Thompson, 1985).

### **2.3.2 Hidrolisis dan Partisi**

Hidrolisis dilakukan dengan penambahan katalis asam yang berguna untuk mempercepat reaksi pemutusan. Ikatan yang akan di putus adalah ikatan glikosida yang mana pemilihan asam kuat seperti HCl di pilih sebagai katalis di sebabkan karena asam kuat akan lebih mudah melepas proton ( $H^+$ ) secara sempurna di dalam air, sedangkan asam lemah relatif lebih sukar sehingga asam lemah memiliki kecenderungan terionisasi sebagian dalam pelepasan ion  $H^+$ .

Hasil hidrolisis akan dilakukan partisi menggunakan pelarut dari yang nonpolar ke yang polar, pelarut yang di gunakan adalah n-heksana, kloroform, dan n-butanol. Prinsip partisi adalah pemisahan kimia berdasarkan perbedaan distribusi diantara dua fase pelarut yang tidak saling bercampur dengan tingkat kepolaran yang berbeda.



### **2.3.3 Uji fitokimia**

Uji fitokimia merupakan pengujian kandungan senyawa-senyawa kimia dalam tumbuhan dengan menggunakan reagen-reagen tertentu. Tumbuhan umumnya mengandung senyawa aktif dalam bentuk metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, steroid, tannin, tripernoid dan lain-lain. Lenny, (2006) menjelaskan bahwa senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa kimia yang umumnya mempunyai kemampuan bioaktivitas dan berfungsi sebagai pelindung tumbuhan.

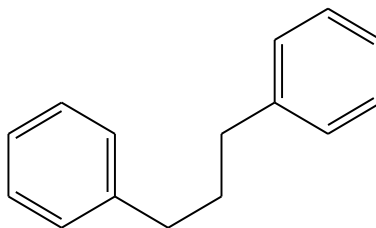
### **2.3.4 senyawa steroid**

Tumbuhan pada umumnya mengandung senyawa aktif dalam bentuk metabolit sekunder yang salah satunya adalah steroid (Lenny, 2006). Identifikasi steroid dapat dilakukan dengan di lakukan uji fitokimia yang merupakan pengujian kandungan senyawa-senyawa di dalam tumbuhan, yang di lakukan dengan cara menggunakan pereaksi warna. Pereaksi yang dapat digunakan adalah reagen Lieberman-Burchard yang menghasilkan warna hijau biru. Reaksi warna yang lain pada steroid di lakukan dengan pereaksi Brieskorn dan Briner (asam klorosulfonat dan Sesolvan NK) menghasilkan warna coklat (Robinson, 1995). Dan juga pereaksi salkowski (kloroform dan asam sulfat) yang dapat menghasilkan warna merah bilamana ujinya positif (Atun, 2014).

### **2.3.5 Flavonoid**

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang tersebar luas di alam, golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai deretan senyawa C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> yang artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C<sub>6</sub> (cincin benzene tersubstitusi) di sambungkan oleh rantai alifatik tiga-karbon. Pengelompokan flavonoid

dibedakan berdasarkan cincin heterosiklik-oksigen tambahan dan gugus hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan pada rantai  $C_6$ , sesuai struktur kimianya yang termasuk flavonoid yaitu flavonol, flavon, flavanon, kaekin antosianidin dan kalkon (Robinson, 1995)



Gambar 2.1 Struktur dasar senyawa flavonoid (Robinson, 1995)

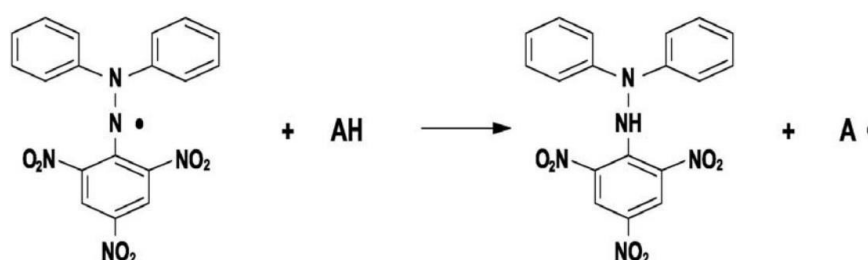
Gambar 2.3 merupakan gugus flavonoid yang kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus  $C_6$  (cincin benzena tersubstitusi) yang disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon. Flavonoid sering terdapat sebagai glikosida. Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenol yang memiliki banyak gugus  $-OH$  dengan adanya perbedaan keelektronegatifan yang tinggi, sehingga sifatnya polar golongan senyawa ini mudah terekstrak dalam pelarut etanol yang memiliki sifat polar karena adanya gugus hidroksil, sehingga akan terbentuk ikatan hidrogen.

### 2.3.6 Alkaloid

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang terbanyak di temukan di alam. Semua alkaloid mengandung paling sedikit satu atom nitrogen yang biasanya bersifat basa dan dalam sebagian besar atom nitrogen ini merupakan bagian dari cincin heterosiklik (Lenny, 2006). Hampir seluruh alkaloid berasal dari tumbuh-tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan.

## 2.4 Uji Antioksidan Dengan Menggunakan Metode DPPH

DPPH merupakan metode yang menggunakan prinsip penangkapan hydrogen dari senyawa antioksidan oleh DPPH. Elektron ganjil pada DPPH akan berpasangan dengan atom hydrogen yang didapat dari senyawa antioksidan. DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk mendeteksi aktivitas antioksidan dari beberapa senyawa atau ekstrak dari bahan alam (Molyneux, 2004). Selain itu, bisa juga dikatakan bahwa DPPH dapat mendeteksi atau menguji aktivitas antioksidan pada pelarut polar maupun non-polar (Prakash, dkk., 2001). Reaksi radikal bebas DPPH dengan atom H netral yang berasal dari senyawa-senyawa yang bersifat antioksidan dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.2 Reaksi radikal bebas DPPH dengan antioksidan

DPPH bersifat nonpolar dengan warna ungu pekat yang mempunyai bentuk tereduksinya yaitu 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH-H) dengan warna jingga kekuningan (Ionita, 2003). Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH akan bekerja maksimal dengan menggunakan pelarut metanol

atau etanol. Hal ini dikarenakan kedua pelarut ini tidak akan mempengaruhi reaksi antara antioksidan dengan DPPH (Molyneux, 2004).

Aktivitas antioksidan ini di tunjukkan dengan parameter berupa harga konsentrasi afisisen. Harga konsentrasi efisien ini biasa disebut *efficient concentration* ( $EC_{50}$ ) atau *Inhibitory concentration* yang merupakan konsentrasi suatu senyawa antioksidan yang dapat menjadikan 50% DPPH kehilangan suatu radikalnya atau konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan persen perendaman sebesar 50% (Molyneux, 2004). Semakin kecil nilai  $EC_{50}/IC_{50}$  dari suatu sampel, maka sampel tersebut semakin efektif sebagai pengangkal radikal bebas (Rohman, dkk., 2006)

## 2.5 Identifikasi Senyawa Dengan Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis adalah suatu analisis yang mengukur resapan suatu larutan yang dilalui radiasi monokromatis. Spektrum ultraviolet dari senyawa organik berikatan erat dengan transisi-transisi diantara tingkatan tenaga elektronik. (sastrohamidjojo, 1998). Spektrum UV senyawa steroid penelitian Al-quais, K., (2015) dari hasil isolasi rumput bambu (Gambar 2.5) mempunyai serapan maksimum pada panjang gelombang 249 dan 255 nm menunjukkan adanya gugus kromofor yang khas untuk sistem ikatan rangkap dari cincin alifatiknya. Berdasarkan data UV-Vis hasil isolasi tersebut berasal dari golongan non aromatik yaitu terpenoid atau steroid. Adanya serapan pada panjang gelombang tersebut diduga akibat adanya transisi elektron dari  $\pi - \pi^*$  yang disebabkan gugus kromofor  $C=C$ .

## **BAB III**

### **METODOLOGI**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan oktober - november 2020 di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### **3.2 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **3.2.1 Alat-alat Penelitian**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *heater*, timbangan analitik, *hotplate*, corong pisah, statif, lemari asam, oven, kaca arloji, pengaduk kaca, spatula, pipet tetes, pipet ukur 1 mL, pipet ukur 5 mL, pipet ukur 10 mL, pipet mikro, labu ukur 10 mL, penjepit kayu, *beakerglass* 100 mL, *beakerglass* 500 mL, bola hisap, Erlenmeyer 250 mL, Erlenmeyer 1000 mL, Erlenmeyer 500 mL, gelas ukur 100 mL, gelas ukur 500 mL, saringan, corong kaca, corong *Buchner*, *rotary evaporator vacuum*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, aluminium foil, kertas saring, seperangkat alat UV-Vis.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Hydrilla verticillata* yang berasal dari Danau Ranu Pasuruan. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah metanol p.a, kloroform p.a, n-heksana p.a, n-butanol p.a, HCl 2 N, natrium bikarbonat, etil asetat, HCl 37% (b/b), HCl 1N, HCl 2% (b/b), metanol 50% (v/v), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, asam asetat anhidrida, aseton, FeCl<sub>3</sub> 1% (b/v), gelatin, pereaksi

Mayer dan Dragendorff, serbuk logam Mg, NaCl, pereaksi Liberman-Burchard, aquades, air, DPPH ( 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini diawali dengan pengambilan sampel diranugrati Grati Pasuruan. Tahap pertama adalah *Hydrilla verticillata* dipreparasi dengan dikeringanginkan pada suhu ruang (25 - 30 °C) setelah kering hydrilla dihaluskan. Selanjutnya *Hydrilla verticillata* diekstraksi dengan metode meserasi menggunakan pelarut methanol *p.a* masa perendaman 24 jam dengan perbandingan 1:10 sehingga didapatkan ekstraksi kasar *Hydrilla verticillata*.

Ekstrak *Hydrilla verticillata* selanjutnya dihidrolisis dengan menggunakan HCl 2 N. Pertama-tama ekstrak yang diperoleh dari hasil pemekatan ditimbang masing-masing sebanyak 1,5 gram kemudian dihidrolisis dengan HCl 2 N sebanyak 3 mL kemudian distirer selama 1 jam dengan menggunakan *hotplate stirrer*. Selanjutnya ditambahkan natrium bikarbonat hingga pH-nya netral. Ekstrak hasil hidrolisis kemudian dipartisi dengan menggunakan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya yaitu n-heksana, kloroform, dan n-butanol. Sampel dipartisi dengan pelarut mulai dari pelarut yang mempunyai tingkat kepolaran paling rendah ke pelarut yang lebih polar.

Masing-masing fraksi kemudian diuji fitokimia dan uji aktivitas antioksidannya dengan variasi konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm. Setelah itu dihitung nilai EC<sub>50</sub>, fraksi yang memiliki nilai EC<sub>50</sub> paling rendah selanjutnya dilakukan identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

### 3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui tahapan-tahapan berikut:

1. Preparasi sampel;
2. Analisis kadar air *hydrilla verticillata*;
3. Ekstraksi komponen aktif sampel *hydrilla verticillata* dengan pelarut metanol p.a menggunakan metode maserasi;
4. Hidrolisis ekstrak pekat *hydrilla verticillata* dengan menggunakan HCl 2N;
5. Partisi ekstrak pekat hasil hidrolisis *hydrilla verticillata* dengan menggunakan variasi pelarut n-heksan, kloroform, dan n-butanol;
6. Uji aktivitas antioksidan menggunakan DPPH;
7. Uji kandungan golongan senyawa aktif;
8. Identifikasi golongan senyawa aktif dengan menggunakan UV-Vis

### 3.5 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.5.1 Preparasi Sampel (biomassa *Hydrilla verticillata*)

Pengambilan sampel di Danau Ranu dilakukan di permukaan air dimana jarak antara permukaan dengan dasar air  $\pm 2$  m. Sampel diambil sebanyak 8 Kg dan dicuci dengan air. Selanjutnya dikeringanginkan pada suhu ruang. Sampel yang sudah kering dihaluskan dengan ukuran 90 mesh di Materia Medika Kota Batu.

#### 3.5.2 Analisis Kadar Air Biomassa *Hydrilla verticillata* (AOAC, 1984)

Analisis kadar air dilakukan pada sampel kering *Hydrilla verticillata* dengan cara sampel ditimbang sebanyak 5 gram, dimasukkan dalam cawan yang sebelumnya telah dihitung berat konstannya, kemudian dikeringkan di dalam oven

pada suhu 100-105 °C selama  $\pm 15$  menit. selanjutnya sampel didinginkan dalam desikator  $\pm 10$  menit dan ditimbang. Sampel tersebut dipanaskan kembali dalam oven  $\pm 15$  menit, didinginkan dalam desikator sekitar  $\pm 10$  menit dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi hingga tercapai berat konstan. Kadar air dalam *hydrilla* dihitung menggunakan Persamaan (3.1)

$$\text{kadar air} = \frac{b-c}{b-a} \times 100\% \dots\dots\dots(3.1)$$

Keterangan: a = berat cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat cawan + sampel setelah dikeringkan

### 3.5.3 Ekstraksi Komponen Aktif

Ekstraksi meserasi komponen aktif *Hydrilla verticillata* dilakukan dengan cara menimbang 100 gram *Hydrilla verticillata* kering, dimasukkan dalam Erlenmeyer kemudian direndam dengan pelarut metanol *p.a* sebanyak 500 mL. Ekstraksi dilakukan selama 24 jam dengan pengocokan menggunakan shaker dengan kecepatan 120 rpm pada suhu kamar. kemudian disaring dengan corong *Buchner* menghasilkan residu dan filtrat. Bagian residu dimeserasi kembali hingga 5 kali meserasi. Filtrat yang diperoleh digabung menjadi satu kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* vacuum hingga diperoleh ekstrak pelat metanol *Hydrilla verticillata* dihitung randemennya dengan menggunakan persamaan (Khopkar, 2003):

$$\% \text{ randemen} = \frac{\text{berat ekstrak kasar yang diperoleh}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \dots\dots\dots(3.2)$$



#### 3.5.4 Hidrolisis Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata*

Hidrolisis ekstrak metanol *Hydrilla verticillata* dilakukan dengan cara menambahkan 10 mL HCl 2 N dalam 5 gram ekstrak pekat metanol dan distirer dengan hot plate stirrer selama 1 jam pada suhu ruang. Selanjutnya dinetralkan pH-nya dengan menambahkan natrium bikarbonat.

#### 3.5.5 Partisi Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata*

Ekstrak pekat metanol 96% *Hydrilla verticillata* yang diperoleh dibagi menjadi 3 bagian dengan jumlah yang sama untuk diekstrak cair-cair menggunakan n-heksana, kloroform, dan n-butanol. Bagian pertama, 2,5 gram ekstrak pekat metanol diekstraksi cair-cair dengan menggunakan pelarut n-heksana, dilakukan dengan cara ditambahkan 12,5 mL n-heksana dalam corong pisah, dikocok selama 15 menit dan didiamkan beberapa saat sampai diperoleh fase air (metanol-air) dan fase organik (n-heksana) secara maksimal (Souza, dkk., 2008). Perlakuan ini diulangi hingga tidak terbentuk 2 lapisan, kemudian fraksi n-heksana yang diperoleh dikumpulkan menjadi satu dan dipekatkan dengan *rotary evaporator vaccum*.

Bagian kedua, 2,5 gram ekstrak pekat metanol diekstraksi cair-cair dengan menggunakan pelarut kloroform, dilakukan dengan cara ditambahkan 12,5 mL kloroform dalam corong pisah, dikocok selama 15 menit dan didiamkan beberapa saat sampai diperoleh fase air (metanol-air) dan fase organik (kloroform) secara maksimal (Souza, dkk., 2008). Perlakuan ini diulangi hingga tidak terbentuk 2 lapisan, kemudian fraksi kloroform yang diperoleh dikumpulkan menjadi satu dan dipekatkan dengan *rotary evaporator vaccum*. Bagian ketiga, 2,5 gram ekstrak

pekat metanol diekstraksi cair-cair dengan menggunakan pelarut n-butanol, dilakukan dengan cara ditambahkan 12,5 mL n-butanol dalam corong pisah, dikocok selama 15 menit dan didiamkan beberapa saat sampai diperoleh fase air (metanol-air) dan fase organik (n-butanol) secara maksimal (Souza, dkk., 2008). Perlakuan ini diulangi hingga tidak terbentuk 2 lapisan, kemudian fraksi n-butanol yang diperoleh dikumpulkan menjadi satu dan dipekatkan dengan *rotary evaporator vaccum*. Masing-masing fraksi hasil partisi ditimbang kemudian dihitung rendemennya menggunakan persamaan 3.2.

### **3.5.6 Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH**

#### **3.5.6.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH**

Etanol 95% dipipet sebanyak 4,5 mL kemudian ditambahkan larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1,5 mL, dimasukkan kedalam kuvet hingga penuh. Selanjutnya dicari  $\lambda_{\max}$  DPPH dan dicatat hasil pengukuran  $\lambda_{\max}$  untuk digunakan pada tahap selanjutnya (Hanani, dkk. 2005).

#### **3.5.6.2 Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran DPPH**

Larutan sampel 5 ppm dipipet sebanyak 6,75 mL. Ditambahkan larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 2,25 mL, kemudian dicari waktu kestabilan tanpa inkubasi dan setelah inkubasi pada suhu 37 °C dan rentangan waktu 5 – 100 menit dengan interval 5 menit. Sampel diukur pada  $\lambda_{\max}$  yang telah diketahui pada tahap sebelumnya (Bariyah, 2013).

#### **3.5.6.3 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel**

Masing-masing ekstrak dilarutkan dalam pelaut etanol 95% dengan konsentrasi 50 ppm dan diuji aktivitas antioksidanya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda_{\max}$  yang telah didapatkan. Selanjutnya hasil uji

aktivitas antioksidan yang terbaik divariasi konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm. Isolat masing-masing konsentrasi dipipet 4,5 mL dan ditambahkan 1,5 mL DPPH 0,2 mM kemudian diinkubasi dengan suhu 37 °C selama 90 menit, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda_{\text{max}}$  yang telah didapatkan. Data absorbansinya yang diperoleh dari tiap konsentrasi masing-masing ekstrak dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidanya (Arindah, dkk. 2010):

$$\text{Aktivitas antioksidan} = \left( \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi DPPH sisa}}{\text{absorbansi kontrol}} \right) \times 100 \% \dots\dots (3.4)$$

Selanjutnya dihitung nilai EC<sub>50</sub> nya dengan memperoleh persamaan regresi menggunakan program “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing dose response data*”. Nilai EC<sub>50</sub> juga dihitung dalam persamaan  $y = ax + b$  yang diperoleh dari kurva regresi linier dari hubungan persen aktivitas antioksidan dan konsentrasi ekstrak antioksidan. EC<sub>50</sub> dihitung dengan cara memasukkan nilai 50% kedalam persamaan kurva standar sebagai sumbu y kemudian dihitung nilai x sebagai konsentrasi EC<sub>50</sub>. Kontrol yang digunakan yaitu larutan DPPH 0,2 mM dalam etanol 95%.

### 3.5.7 Uji Fitokimia (Kristanti, dkk., 2008)

Isolat senyawa yang memiliki sifat antioksidan paling tinggi diuji kandungan golongan senyawa aktif alkaloid, flavonoid, terpenoid, steroid, saponin dan tanin.

#### **3.5.7.1 Uji Flavonoid (Kristanti, dkk., 2008)**

Ekstrak hydrilla dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dalam 1-2 mL metanol panas 50%. Setelah itu ditambah logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavonoid.

#### **3.5.7.2 Uji Alkaloid (Kristanti, dkk., 2008)**

Ekstrak hydrilla dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 0,5 mL HCl 2% dan larutan dibagi dalam dua tabung. Tabung I ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendorff, tabung II ditambahkan 2-3 reagen Mayer. Jika tabung I terbentuk endapan jingga dan pada tabung II terbentuk endapan kekuning-kuningan menunjukkan adanya alkaloid.

#### **3.5.7.3 Uji Saponin (Harborne, 1987)**

Ekstrak hydrilla dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambah air (1:1) sambil dikocok selama 1 menit, apabila menimbulkan busa ditambahkan HCl 1 N, busa yang terbentuk dapat bertahan selama 10 menit dengan ketinggian 1-3 cm, maka ekstrak positif mengandung saponin.

#### **3.5.7.4 Uji Triterpenoid dan Steroid (Kristanti, dkk., 2008)**

Ekstrak hydrilla dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Campuran ini ditambah dengan 1-2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid.

#### **3.5.7.5 Uji Tanin (Sarker & Nahar, 2009)**

##### **a. Uji dengan $\text{FeCl}_3$**

Ekstrak hydrilla ditambahkan dengan 3 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  1%. Jika larutan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tinta maka mengandung tanin

##### **b. Uji dengan Larutan Gelatin**

Ekstrak hydrilla sebanyak 2 mg dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah dengan larutan gelatin. Jika terbentuk endapan putih menunjukkan adanya tanin.

#### **3.5.8 Identifikasi dengan UV-Vis**

Hasil ekstrak dengan aktivitas antioksidan paling tinggi diidentifikasi menggunakan UV-Vis. Pelarut dan Isolat steroid yang telah dilarutkan dalam pelarutnya dianalisis pada panjang gelombang 200-800 nm

### **3.6 Analisis Data**

Data hasil pengamatan juga dianalisis menggunakan analisis nalar dan spiritual islam. Analisis ini menggunakan sumber dari beberapa ayat Al-Qur'an dan tafsirnya yang sesuai dengan penelitian serta pemikiran-pemikiran islam. Hal ini dilakukan untuk menunjukkan sebagai khalifah di bumi dan tanggung jawab sebagai ilmuwan islam.

## **BAB IV**

### **PEMBAHASAN**

#### **4.1 Preparasi Sampel *Hydrilla verticillata***

Penelitian ini menggunakan tanaman *Hydrilla verticillata* dari danau Ranu Grati, Pasuruan. Beberapa tahap preparasi sampel yang dilakukan dalam penelitian ini diantaranya, pencucian, pengeringan, kemudian dijadikan serbuk hydrilla. Pencucian bertujuan untuk membersihkan sampel dari kotoran yang menempel pada Hydrilla, selanjutnya dilakukan pengeringan yang bertujuan untuk mengurangi kandungan air di dalam sampel dan dapat meminimalisir dan juga mencegah tumbuhnya jamur supaya dapat disimpan dalam jangka waktu tertentu. Proses pengeringan sampel dilakukan dengan cara diangin-anginkan tanpa menggunakan pemanasan sinar matahari. Senyawa aktif dalam sampel organik rentan sekali mengalami kerusakan oleh karena itu pada proses pengeringan sampel tanpa menggunakan pemanasan matahari, agar senyawa aktif yang di inginkan tidak mengalami kerusakan akibat suhu yang tinggi. Pengeringan dihentikan ketika sampel sudah mulai berubah warna, Sampel basah memiliki warna yang hijau segar, dan pengeringan dihentikan ketika sampel sudah berwarna coklat dan layu.

Permukaan bahan yang luas bisa mempermudah pada tahap ekstraksi. Proses penghalusan dan pengayakan bertujuan untuk memperluas permukaan bahan. Sampel dalam bentuk serbuk dengan tingkat penghalusan yang tinggi, kemungkinan terjadinya kerusakan sel-sel akan semakin besar sehingga

memudahkan pelarut mengambil kandungan yang terdapat dalam sampel. Sampel basah hydrilla dari berat 8 Kg dikeringkan kemudian digiling dengan ukuran 8 Mesh, diperoleh serbuk keringnya sebanyak 435 g.

#### **4.2 Analisis Kadar Air *Hydrilla verticillata***

Menyatakan kadar air yang rendah dapat mempermudah proses penarikan zat aktif dalam sampel karena pelarut mudah menembus dinding sel sampel tanpa adanya gangguan dari molekul air. Kadar air dalam sampel harus seminimal mungkin, agar kerusakan akibat degradasi oleh mikroorganisme dapat diminimalkan serta mencegah tumbuhnya jamur sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama dan tidak merusak komposisi kimia di dalamnya Khoiriyah, dkk. (2014).

Analisis kadar air dilakukan dengan menggunakan metode *thermogavimetri* yaitu mengurangi kadar air dalam sampel dengan pemanasan menggunakan oven 100-105 °C.

Hasil penentuan kadar air sampel pada penelitian ini sebesar 9,4 %. Kadar air maksimum yang disyaratkan untuk berlangsungnya ekstraksi secara maksimal yaitu sebesar 11 % (Nurmillah, 2009).

#### **4.3 Ekstraksi Komponen Aktif**

Pemisahan metabolit sekunder dalam penelitian ini menggunakan metode ekstraksi maserasi. Dilakukan metode maserasi karena metode ini memiliki beberapa kelebihan diantaranya yaitu proses nya mudah. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan dengan proses ekstraksi maserasi menggunakan pelarut

metanol p.a yang bersifat polar. Dengan harapan senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam hydrilla dapat terekstrak sesuai dengan sifat polar dari metanol. Sebagaimana prinsip *like dissolved like* yaitu senyawa akan larut kedalam pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang sama.

Proses maserasi dihentikan ketika warna filtrat dari sampel sudah berubah, yaitu dari hijau pekat menjadi hijau yang lebih bening yang diasumsikan senyawa di dalam hydrilla telah terekstrak secara maksimal. Filtrat hasil maserasi menggunakan metanol yang telah diperoleh dijadikan satu dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* untuk memperoleh ekstrak kasar metanol. Hasil pemekatan ekstrak kasar metanol hydrilla memiliki warna hijau kehitam-hitaman dan kental.

Randemen yang dihasilkan dari penelitian ini adalah sebesar 6,5 %. Hasil penelitian Hafiz (2017) randemen yang diperoleh untuk ekstrak metanol dari hydrilla sebesar 12,72 %. Perbedaan rendemen terjadi karena perbedaan kadar air yang terkandung di dalam sampel. Pada penelitian Hafiz (2017) kadar air yang dihasilkan sebesar 8,218 % sedangkan pada penelitian ini kadar air yang dihasilkan sebesar 9,4 %. Kandungan air di dalam sampel akan mempengaruhi proses ekstraksi. Kadar air yang terlalu tinggi akan menghalangi masuknya pelarut ke dalam dinding sel. Pelarut metanol akan berikatan hidrogen dengan air yang terdapat pada sampel, sehingga kandungan air di dalam sampel juga ikut terekstrak.



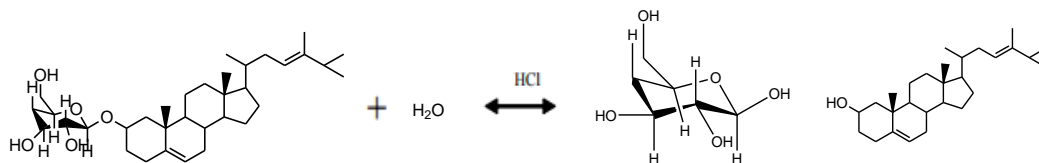
#### 4.4 Hidrolisis Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata*

Senyawa organik pada tanaman umumnya terdapat dalam bentuk ikatan glikosida yaitu senyawa yang terdiri dari gabungan dua bagian senyawa yaitu gugus gula dan gugus bukan gula. Proses hidrolisis akan memutuskan ikatan glikosida menjadi glikon dan aglikon dengan bantuan katalis asam. Hidrolisis senyawa aktif ekstrak metanol dilakukan dengan menggunakan katalis asam HCl 2 N. Dimana setelah penambahan katalis asam tersebut senyawa metabolit sekunder yang terikat pada gugus aglikon akan terputus.

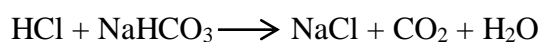
Pemutusan gugus aglikon dilakukan dengan menggunakan asam kuat karena berfungsi untuk mempercepat reaksi pemutusan ikatan glikosida, selain itu sifat garam yang terbentuk pada penetralan (NaCl) tidak menimbulkan gangguan. Handoko (2012) menyebutkan pemilihan asam kuat seperti HCl sebagai katalis karena asam kuat akan lebih mudah melepas proton ( $H^+$ ) secara sempurna di dalam air, sedangkan asam lemah relatif lebih sukar sehingga asam lemah memiliki kecenderungan terionisasi sebagian dalam pelepasan ion  $H^+$ . semakin banyak proton yang terionisasi dalam air, maka semakin kuat peranan proton dalam pemutusan ikatan glikosida.

Penetralan dilakukan dengan larutan basa lemah natrium bikarbonat bertujuan untuk menghentikan reaksi hidrolisis yang ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung yaitu gas  $CO_2$  yang mengidentifikasi bahwa HCl dan  $NaHCO_3$  sudah bereaksi. Reaksi hidrolisis merupakan reaksi yang bersifat *reversible* (bolak-balik), sehingga apabila tidak dilakukan penetralan maka reaksi pembentukan ikatan glikosida antara glikon dan aglikon akan terbentuk

kembali. Adapun reaksi pemutusan ikatan glikosida ketika penambahan HCl dan penetralan dengan NaHCO<sub>3</sub> ditunjukkan pada Gambar 4.1 dan persamaan 4.1.



Gambar 4.1 Reaksi Hidrolisis Ikatan O-glikosida



Persaman 4.1 Reaksi Antara HCl dan NaHCO<sub>3</sub>

Hasil hidrolisis yang diperoleh berwarna hijau kehitaman dan muncul gelembung – gelembung gas CO<sub>2</sub> yang mengidentifikasi bahwa HCl dan NaHCO<sub>3</sub> sudah bereaksi.

#### 4.5 Partisi Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata*

Partisi merupakan tahapan untuk memisahkan senyawa metabolit sekunder yang telah terlepas ikatannya dari gugus gula, berdasarkan distribusi komponen target pada dua pelarut yang tidak saling bercampur. Partisi komponen aktif ekstrak metanol *Hydrilla* dilakukan dengan menggunakan variasi pelarut yaitu n-heksana, kloroform dan n-butanol. Pengekstrakan senyawa metabolit sekunder dilakukan dengan variasi pelarut karena senyawa metabolit sekunder dapat bersifat polar, semipolar maupun non polar. n-heksana merupakan pelarut organik yang bersifat non polar, kloroform bersifat semipolar dan n-butanol merupakan pelarut organik yang bersifat polar. Masing-masing pelarut akan melarutkan senyawa metabolit sekunder yang memiliki kepolaran yang sama.

Partisi senyawa metabolit sekunder dilakukan dengan cara partisi tidak bertingkat. Hasil penelitian ekstraksi cair-cair pada masing-masing pelarut dihasilkan dua lapisan yang tidak saling bercampur. Proses partisi ini dilakukan sampai ekstrak pada fase air berwarna pucat.

Partisi menggunakan pelarut n-heksana, kloroform dan n-butanol menghasilkan dua lapisan yang tidak saling bercampur. Partisi dengan pelarut n-heksana dan n-butanol pada lapisan atas merupakan fase organik dan pada lapisan bawah merupakan fase air. Sedangkan partisi dengan pelarut kloroform pada lapisan atas merupakan fase air dan pada lapisan bawah merupakan fase organik. Lapisan pada fase air berisi sisa-sisa pelarut metanol yang kemungkinan masih tersisa pada ekstrak dan garam serta air yang dihasilkan pada proses hidrolisis. Sedangkan lapisan bawah merupakan fase organik, yang berisi pelarut dan komponen yang terlarut pada pelarut tersebut. Fase organik pada fraksi n-heksana dan n-butanol berada pada lapisan atas karena berat jenis n-heksana (0,655 g/mL) dan n-butanol (0,81 g/mL) lebih kecil dibandingkan berat jenis air (1 g/mL). sedangkan pada fraksi kloroform fase organik berada pada lapisan bawah karena berat jenis kloroform (1,498 g/mL) lebih besar dibandingkan berat jenis air (1 g/mL).

Pembentukan dua lapisan yang tidak saling bercampur pada setiap pelarut disebabkan karena adanya perbedaan sifat kepolaran. Tingkat kepolaran suatu pelarut dapat ditunjukkan dengan nilai konstanta dielektrik, dimana semakin besar nilai konstanta dielektrik maka semakin polar suatu pelarut. Konstanta dielektrik air yaitu sebesar 80; n-heksana sebesar 1,9; kloroform sebesar 4,8; dan n-butanol 18. Perbedaan nilai konstanta dielektrik antara air dengan masing-masing pelarut

yang cukup jauh mengakibatkan pelarut-pelarut tersebut tidak dapat saling bercampur dengan air dan menyebabkan terbentuknya dua lapisan. Hasil rendemen masing-masing ekstrak ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Rendemen Hasil Partisi

<b>Pelarut</b>	<b>Warna</b>	<b>Warna Ekstrak</b>	<b>Rendemen</b>
	<b>Filtrat</b>	<b>Pekat</b>	
n-heksana	Hijau	Hijau kehitaman	90,66
Kloroform	Hijau	Hijau kehitaman	40,66
n-butanol	Hijau	Hijau kehitaman	76

Berdasarkan hasil penelitian, rendemen ekstrak *Hydrilla* pada fraksi n-heksana cenderung lebih besar dibandingkan fraksi kloroform dan juga n-butanol. Diduga senyawa metabolit sekunder dalam *Hydrilla* lebih bersifat non polar. Haryadi (2012) menyebutkan berdasarkan hasil uji fitokimia, senyawa-senyawa yang bersifat non polar seperti steroid akan terekstrak ke dalam pelarut yang bersifat non polar seperti n-heksana.

#### 4.6 Uji Fitokimia dengan Reagen

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif pada tanaman. Uji fitokimia dilakukan terhadap golongan senyawa flavonoid, tanin, alkaloid, triterpenoid/steroid dan saponin. Hasil pengujian fitokimia dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil Uji Fitokimia Masing-Masing Ekstrak

Golongan Senyawa	Ekstrak				
	Aktif	Metanol	n-Heksana	Kloroform	n-Butanol
Alkaloid					
- Mayer		++	-	++	++
- Dragendorff		-	-	-	-
Flavonoid					
		-	-	-	-
Saponin		++	+	++	++
Triterpenoid		-	-	+	-
Steroid		+++	++	++	++
Tanin					
- FeCl <sub>3</sub>		-	-	-	-
- Gelatin		+	-	-	+

Keterangan: + = positif mengandung senyawa

- = tidak mengandung senyawa

#### 4.7 Uji Alkaloid

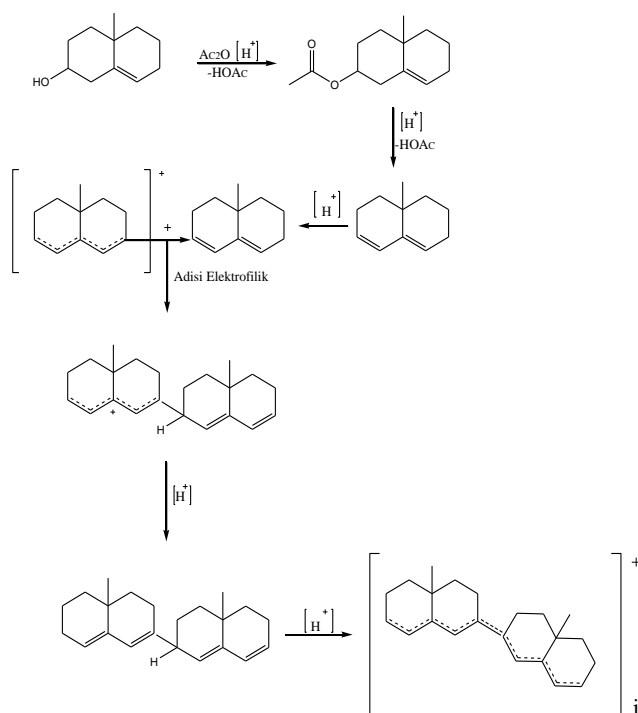
Alkaloid golongan senyawa basa bernitrogen oleh karena itu Uji senyawa alkaloid dilakukan dengan penambahan HCl pada ekstrak sampel, bertujuan untuk mengekstrak senyawa alkaloid dikarenakan sifat alkaloid yang basa. Analisis kualitatif untuk menunjukkan adanya alkaloid dapat diperoleh dengan menggunakan reagen Dragendorf dan Mayer. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuk endapan jingga setelah diberi pereaksi Dragendorf, sedangkan pada uji



pengujian menunjukkan ekstrak metanol, fraksi *n*-heksana, kloroform dan *n*-butanol positif mengandung saponin.

#### 4.9 Uji Triterpenoid/Steroid

Uji senyawa triterpenoid/steroid menggunakan reagen Liebermann-Burchard yaitu menggunakan asam asetat anhidrat dan asam sulfat. Ekstrak metanol, fraksi *n*-heksana, kloroform dan *n*-butanol menunjukkan adanya senyawa steroid yang ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau kebiruan pada larutannya. Sedangkan adanya senyawa triterpenoid yang ditandai dengan terbentuknya cincin kecoklatan pada perbatasan dua pelarut hanya dimiliki oleh fraksi kloroform. Perubahan warna yang terjadi disebabkan adanya reaksi oksidasi golongan senyawa steroid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi (senyawa pentaenilik) (Sriwahyuni, 2010). Dugaan reaksi antara senyawa triterpenoid/steroid dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Dugaan reaksi senyawa triterpenoid/steroid dengan reagen Liebermann-Burchard (Setyowati, dkk., 2014)

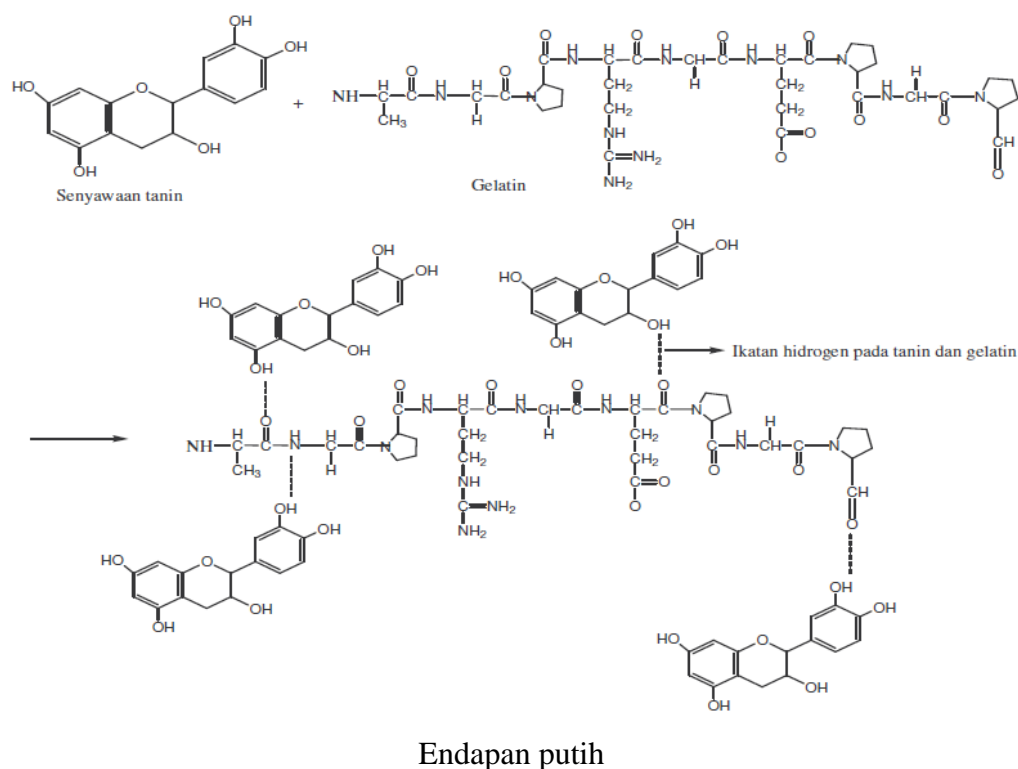
Dalam tabel 4.5 steroid mengandung nilai positif yang lebih banyak, nilai Positif dapat dilihat dari warna kepekatan warnanya. Hal ini menunjukkan tanaman *hydrilla verticillata* mengandung banyak steroid.

#### 4.10 Uji Tanin

Uji tanin pada penelitian ini dilakukan dengan 2 cara yaitu menambahkan ekstrak dengan larutan  $\text{FeCl}_3$  dan gelatin. Uji positif tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kehitaman setelah ditambahkan larutan  $\text{FeCl}_3$ . Hal ini apakah suatu bahan atau sampel mengandung gugus fenol. Sedangkan, uji positif tanin pada penambahan gelatin ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih pada larutan uji.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa uji tanin dengan menggunakan  $\text{FeCl}_3$  memberikan hasil negatif untuk semua ekstrak sedangkan uji tanin menggunakan larutan gelatin menghasilkan reaksi positif terhadap ekstrak metanol dan fraksi n-butanol. Tanin merupakan himpunan polihidroksi fenol, gugus hidroksi dari tanin akan membentuk ikatan hidrogen dengan gelatin. Harborne (1987) menyatakan semua tanin akan menimbulkan endapan sedikit atau banyak jika ditambahkan dengan gelatin. Dugaan reaksi senyawa tanin dengan gelatin dapat dilihat pada Gambar 4.5.

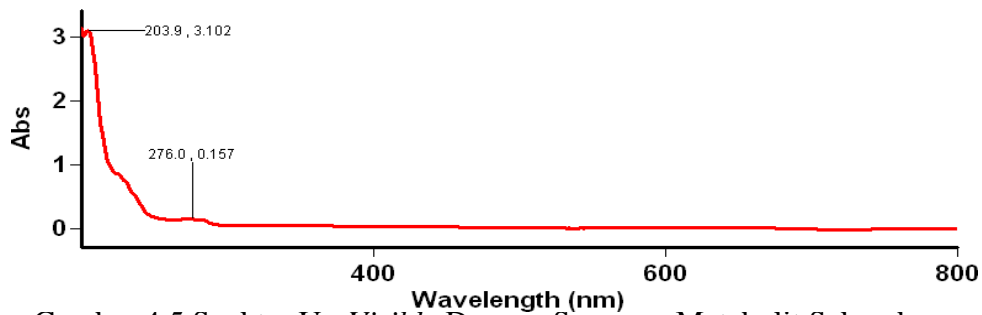




Gambar 4.6 Dugaan reaksi antara tanin dan gelatin (Halimah, 2010)

#### 4.11. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Hasil analisis ekstrak metanol *hydrilla verticillata* menggunakan spektrofotometer UV-Vis memberikan dua puncak serapan seperti pada gambar 4.6, pada panjang gelombang 205 nm diduga merupakan serapan dari pelarut metanol. Menurut Silverstein (1986), batas terendah kebeningan dari metanol dekat 205 nm. Serapan kedua yaitu pada panjang gelombang 276 nm. Menurut Khopkar (2007), transisi yang terjadi pada rentang panjang gelombang 186 – 280 nm menunjukkan adanya gugus kromofor C=C terkojugasi, dimana terjadi transisi elektron dari  $\pi-\pi^*$ .

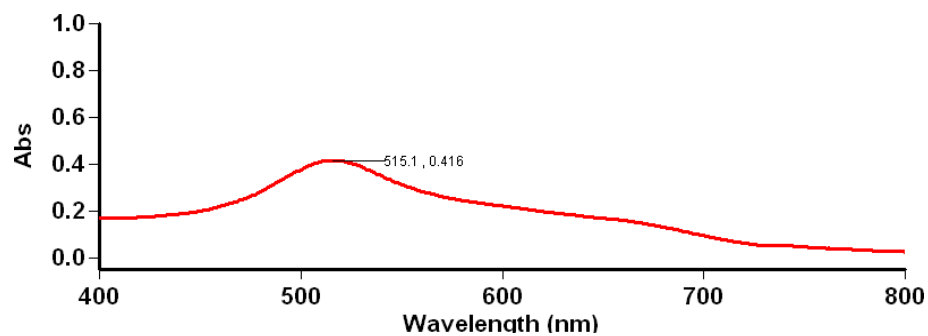


Gambar 4.5 Spektra Uv-Visible Dugaan Senyawa Metabolit Sekunder

#### 4.12. Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan terhadap DPPH diawali dengan penentuan panjang gelombang maksimum dari DPPH. Penentuan dari panjang gelombang maksimum ini bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang yang mempunyai serapan tinggi. Pengukuran sampel dilakukan panjang gelombang maksimum untuk mengoptimalkan kepekaan DPPH dan meminimalkan kesalahan (Rohman dan Gandjar, 2007).

Panjang gelombang maksimum yang digunakan dalam pengukuran uji aktivitas antioksidan sangat bervariasi. Panjang gelombang maksimum yang digunakan yaitu 515 nm (kuntorini, E. dan Astuti, 2010; Hanani, E., dkk., 2005), 516 nm (Julyasih, S., dkk., 2013). Hasil penentuan panjang gelombang maksimum DPPH 0,2 mM diperoleh 515 nm. Hasil spektra UV-Vis larutan DPPH di tunjukkan pada gambar



Gambar 4.6 Spektra UV-Vis DPPH

Penentuan panjang gelombang maksimum yang telah di peroleh, selanjutnya di gunakan untuk uji aktivitas antioksidan pada isolat. senyawa steroid.

#### **4.13 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel**

Pengujian aktivitas antioksidan pada isolat pelarut dengan variasi konsentrasi 1,2,3,4,dan 5 ppm, kemudian di ukur serapannya pada gelombang 515 nm. Pembuatan larutan DPPH di buat dengan keadaan baru untuk menghindari terjadinya perubahan nilai yang signifikan.

Absorbansi kontrol dan absorbansi isolat yang diperoleh digunakan untuk menentukan persen (%) aktivitas antioksidan. Persen aktivitas antioksidan ini menunjukkan kemampuan suatu antioksidan dalam menghambat radikal bebas dengan atom hidrogen yang terdapat pada senyawa antioksidan yang menangkap radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) (Rahayu et al., 2010). Hasil pengukuran dari aktivitas antioksidan yang dilakukan memberikan gradasi warna menjadi ungu muda (memudar).

Parameter yang digunakan dalam penentuan aktivitas antioksidan adalah persen aktivitas antioksidan dan nilai  $EC_{50}$  persen (%) aktivitas dari antioksidan yang telah diperoleh telah di analisis menggunakan persamaan regresi non linier dengan *Graphpad prism software, Regression for analyzing doseresponse data*, sehingga didapatkan nilai  $EC_{50}$  dari masing-masing isolat.  $EC_{50}$  merupakan kosentrasi dari larutan substrat atau sampel yang mampu mereduksi aktivitas DPPH sebesar 50% semakin kecil nilai  $EC_{50}$  berarti semakin tinggi nilai aktivitas antioksidan (Molyneux,2004).

Tabel 4.3 Hasil pengukuran aktivitas antioksidan pada sampel

<b>Konsentrasi (ppm)</b>	<b>% Aktivitas Antioksidan</b>		
	<b>n-Heksana</b>	<b>Kloroform</b>	<b>n-Butanol</b>
1	14,58 %	12,25 %	12,92 %
2	18,14 %	10,01 %	15,75 %
3	15,43 %	10,10 %	14,58 %
4	04,12 %	0,95 %	13,98 %
5	10,51 %	09,91 %	22,56 %
EC <sub>50</sub>	-	-	510,2 ppm

Berdasarkan tabel 4.8 Dapat dikeathui bahwa nilai konsentrasi 5ppm memiliki nilai yang besar pada aktivitas antioksidan. Pelarut N-butanol menunjukkan memiliki nilai EC<sub>50</sub> 510,2 ppm, untuk pelarut N-heksana dan kloroform tidak menunjukkan nilai EC<sub>50</sub> hal ini di karenakan nilai dari nilai persen aktivitasnya tidak linear. Di duga nilai yang tidak linear karena warna kepekatan sampel yang berbeda beda sehingga di hasilkan nilai % aktivitas antioksidan yang tidak linear

#### 4.14 Pemanfaatan *Hydrilla verticillata* dalam Prespektif Islam

. Berdasarkan beberapa penelitian menyebutkan bahwa tanaman dapat dimanfaatkan sebagai obat. Sebagaimana Allah SWT berfirman dalam Qs. Asy-Syu'araa ayat 7:

﴿أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ﴾

Artinya:

*“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di Bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?” (Qs. Asy-Syu'araa:7)*

Tumbuhan yang baik adalah tumbuhan yang subur dan bermanfaat bagi makhluk hidup. Shihab, (2002) menjelaskan tumbuhan yang bermacam-macam jenisnya dapat dimanfaatkan sebagai obat berbagai penyakit. Salah satu tanaman yang memiliki manfaat yaitu *Hydrilla verticillata*. Hydrilla merupakan salah satu tanaman dalam air yang Allah SWT ciptakan yang merupakan komponen abiotik yang diciptakan di Bumi. Selain air, Allah SWT juga menciptakan komponen abiotik lainnya seperti angin, cahaya, tanah, garam mineral, suhu dan lain-lain. Komponen-komponen abiotik tersebut dapat membantu kehidupan komponen biotik, seperti Hydrilla. Air yang mengandung garam-garam mineral seperti K, P, Ca, Mg dan lain sebagainya (Marer dan Gaevey, 2012) yang terkandung di dalamnya dapat membantu pertumbuhan hydrilla sehingga hydrilla dapat hidup dan menghasilkan senyawa-senyawa yang bermanfaat.

Senyawa-senyawa yang bermanfaat yang terkandung di dalam tanaman hydrilla dalam penelitian ini terbukti memiliki kemampuan sebagai obat. Penelitian yang dilakukan Hafiz, (2017) menunjukkan bahwa senyawa metabolit sekunder pada tanaman *Hydrilla verticillata* yang diekstrak memiliki bioaktivitas. Ekstrak n-heksana *Hydrilla verticillata* menunjukkan nilai  $LC_{50}$  sebesar 16,762 ppm dimana bahwa senyawa tersebut bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Ekstrak n-heksana *Hydrilla verticillata* mengandung senyawa aktif berupa senyawa steroid yang dapat dimanfaatkan dan menjadi acuan di bidang farmasi dan kedokteran.

Hasil penelitian tersebut merupakan salah satu bukti kekuasaan Allah SWT. Hydrilla yang selama ini hanya dianggap sebagai gulma yang mengganggu penggunaan air, ternyata memiliki manfaat yang luar biasa. Hal ini menunjukkan kebenaran ayat-ayat Al-qur'an yang banyak menjelaskan bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu tidak ada yang sia-sia. Semua yang Allah SWT ciptakan memiliki manfaat, kegunaan dan hikmah. Dengan adanya penelitian ini kita dapat menemukan dan mengetahui rahasia alam tumbuhan. Di dalam surat al An'am Ayat 99 Allah SWT menutup ayatNya dengan "sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman", karena pada dasarnya orang-orang yang beriman hidup, bekerja, berfikir tentang kebesaran dan kekuasaan Allah SWT.

## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **5.1 KESIMPULAN**

- 1 Fraksi hasil partisi ekstrak metanol *Hydrilla Verticilla* bersifat antioksidan terhadap pelarut n-butanol yang menunjukkan dengan nilai  $EC_{50}$  510,2 ppm yang menunjukkan antioksidan sedang,
2. Hasil analisis spektrofotometer UV-Vis menghasilkan serapan maksimum pada panjang gelombang maksimum yaitu 203,9 dan 276 nm. Menunjukkan adanya gugus kromofor C=C terkonjugasi, terjadi electron dari  $\pi-\pi^*$ .

#### **5.2 SARAN**

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji antioksidan fraksi n-h=Heksana, n-Butanol, dan kloroform, dengan menggunakan metode uji antioksidan yang lain, seperti FRAP dan FIC

## DAFTAR PUSTAKA

- Ad-Dimasyqi, A.A.F.I.I.K. (2001). Tafsir Ibnu Kasir Juz 7. Bandung: Sinar Baru Algesindo.
- Afif, S., Fasya, A.G & Ningsih, R. 2015. Extraction Toxicity Assay and Identification of Active Compounds of Red Algae (*Eucheuma cottoni*) from Sumenep Madura. *ALCHEMY*, 4( 2): 101-106.
- Agilent Technologies, (2001), Agilent LC-MS Primer. U.S.A 5988-2045EN.
- Agustian, R., Yudiati, E., dan Sedjati, S. 2013. Uji Toksisitas Ekstrak Pigmen Kasar Mikroalga *Spirulina Platensis* dengan Metode Uji BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). *Journal Of Marine Research Volume 2, Nomor 1, Halaman 25-31*.
- Al-Maraghi, A.M. (1980). *Terjemah Tafsir Al-Maraghi 7*. Semarang: CV. Toha Putra Semarang.
- Amaliyah, S. (2013). Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *Skripsi*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim .



Annie, S.W., Raveen, R., Paulraj, M.G., Samuel, T & Arivoli, S. 2016. Screening of *Hydrilla verticillata* (L. F.) Royle (Hydrocharitaceae) crude leaf extracts for larvicidal efficacy against the filarial vector *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). *International Journal of Entomology Research*. 1(3): 43-48.

AOAC. 1984. *Official Methods Of Analysis Of The Association Of Official Analytical Chemist*, Inc. Washington Dc.

Bariyyah, S.K., Fasya, A.G., Abidin, M & Hanapi, A. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Cahyono, A.B. 2004. *Keselamatan kerja bahan kimia di industri*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Day, R.A. A.L. Underwood. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Jakarta : Erlangga.

Desianti, N., Fasya, A.G., & Adi, T.K. 2014. Uji toksisitas dan identifikasi golongan senyawa aktif fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter, dan n-heksana hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.*

Skripsi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Kimia.

Diastutik, H & Warsinah. 2010. Identifikasi Senyawa Antikanker dari Ekstrak Kloroform Kulit Batang *Rhizopora Mucronata*. *Majalah farmasi Indonesia*, 21(4), 266-271.

Diaz, B C, A. Segura Carretero, A. Fernandez-Gutierrez, A. Belmonte Vega, A.

Farihah. 2008. Uji toksisitas ekstrak daun *ficus benjamina* l. terhadap *Artemia salina* leach dan profil kromatografi lapis tipis. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Guenther, E. 1987. Minyak Atsiri Jilid I. (K. S, Trans.) Jakarta: UI Press.

Hafiz, Nur, M. 2017. Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Metanol, Kloroform Dan N-Heksana *Hydrilla Verticillata* (L.F) Royle Dari Danau Ranu Kab.Pasuruan Terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Leach. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Hagerman, A.E. (2002). *Condensed Tannin structural chemistry*. department of chemistry and biochemistry, Miami University, Oxford, OH 45056.

- Halimah, N. (2010). Uji fitokimia dan uji toksisitas ekstrak tanaman anting-anting (*Acalypha indica* Linn) terhadap larva udang (*Artemia salina* Leach). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Handoko, D. S. (2006). Kinetika hidrolisis maltosa pada variasi suhu dan jenis asam sebagai katalis. *SIGMA: Jurnal Sains dan Teknologi*, 9(1).
- Handoko, D.S.P. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam sebagai Katalis. *Jurnal SIGMA*, Volume 9, Nomor 1, ISSN 1410-5888. Jember: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember.
- Harbone, J.B. 1987. *Metode Fitokimia :Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terjemahan K. Padmawinata& I. Sudiro. Bandung: ITB.
- Hart, H. 1987. Kimia Organik Suatu Kuliah Singkat. Penerjemah. Achmadi, S. Jakarta: Erlangga.
- Haryadi, D. 2012. Senyawa Fitokimia dan Sitotoksitas Ekstrak Daun Surian (*Toona sinensia*) terhadap Sel Vero dan MCF-7. *Skripsi*. Bogor: Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Karger, BL., Synder, L., dan Hosvarth C. 1973. *An Introduction to Separation*. Brisbane: John dan Sons.

- Khalaf, I., Corciovia, A., Vlase, L., Ivanescu, B., Lazar, D. 2011. LC/MS Analysis of Sterolic Compound from *Glycyrrhiza Glabra*. *Journal STUDIA UBB CHEMIA*, 3(1): 97-102.
- Khoiriyah, S. Hanapi, A., dan Fasya, A. G. 2014. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat, Kloroform dan Petroleum Eter Ekstrak Metanol Alga Coklat *Sargassum Vulgare* dari Pantai Kapong Pamekasan Madura. *ALCHEMY. Vol. 3 No. 2*. Hal 133-144.
- Khopkar, S.M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta : UI Press.
- Krisna, I.G. 2014. Senyawa Steroid pada Daun Gayam *Inocarpus gafiferus* (Fosb) dan Aktivitasnya sebagai Antioksidan Terhadap Difenil Hidrazil (DPPH). *Jurnal Kimia* 8, 251-256.
- Kristanti, A.N., Aminah, N.S., Tanjung, M., & Kurniadi, B. 2008 *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: UNAIR Press.
- Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Quran. 2015. *Jasad Renik dalam Perspektif AL-Qur'an dan Sains*. Jakarta: LIPI.
- Lenny, S. 2006. *Senyawa Terpenoid dan Steroid*. Sumatera Utara :Universitas Sumatera Utara.

Mardaneni, I., Fasya, A.G., Amalia, S., & Aini. N. 2017. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Fraksi Etil Asetat Perairan Wongsorejo-Banyuwangi dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan LC-MS/MS. *Skripsi*. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Mardiyah, U., Fasya, A.G., Fauziyah, B., & Amalia, S. 2012. Ekstraksi, Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

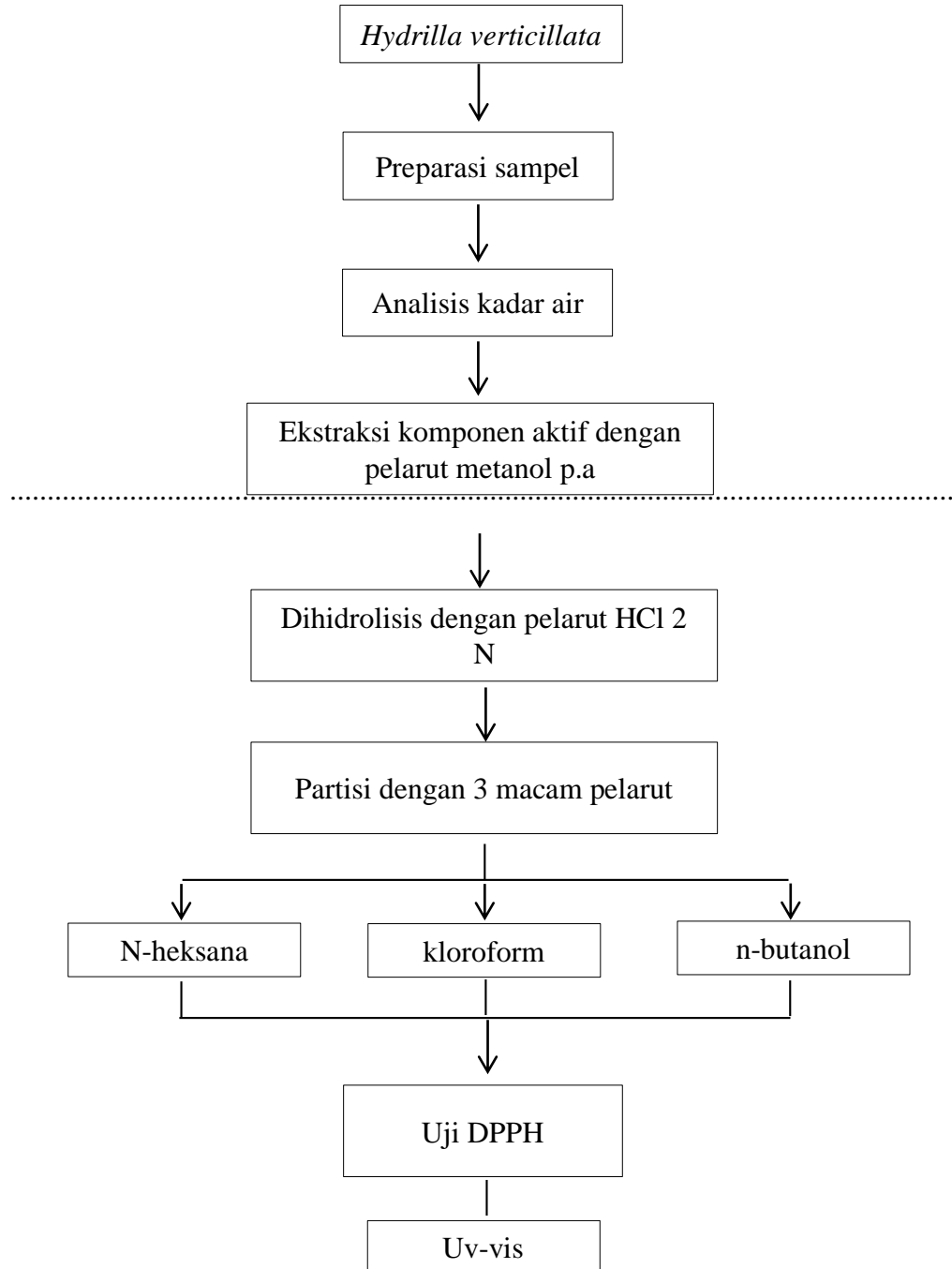
Marer, P.J., dan Garvey, K.K. 2001. *Aquatic pest control*. USA: University of California.

Marliana, S. D., Venty S., & Suyono. (2005). Skrining fitokimia dan analisis kromatografi lapis tipis komponen kimia buah labu siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam ekstrak etanol. *Jurnal Biofarmasi* 3 (1): 26-31.

Marraskuranto, E., Nurrahmi, D, F., Hedi, I, J., & Thamrin, W. 2008. Aktivitas Antitumor (Hela dan T47D) dan Antioksidan Ekstrak Makroalga Hijau

## LAMPIRAN

### 1. Rancangan Penelitian



## 2. Preparasi Sampel

Sampel
--------

- dicuci *H. verticillata*
- dikeringkan tanpa menggunakan sinar matahari langsung
- dihaluskan dengan ukuran 90 mesh

Hasil
-------

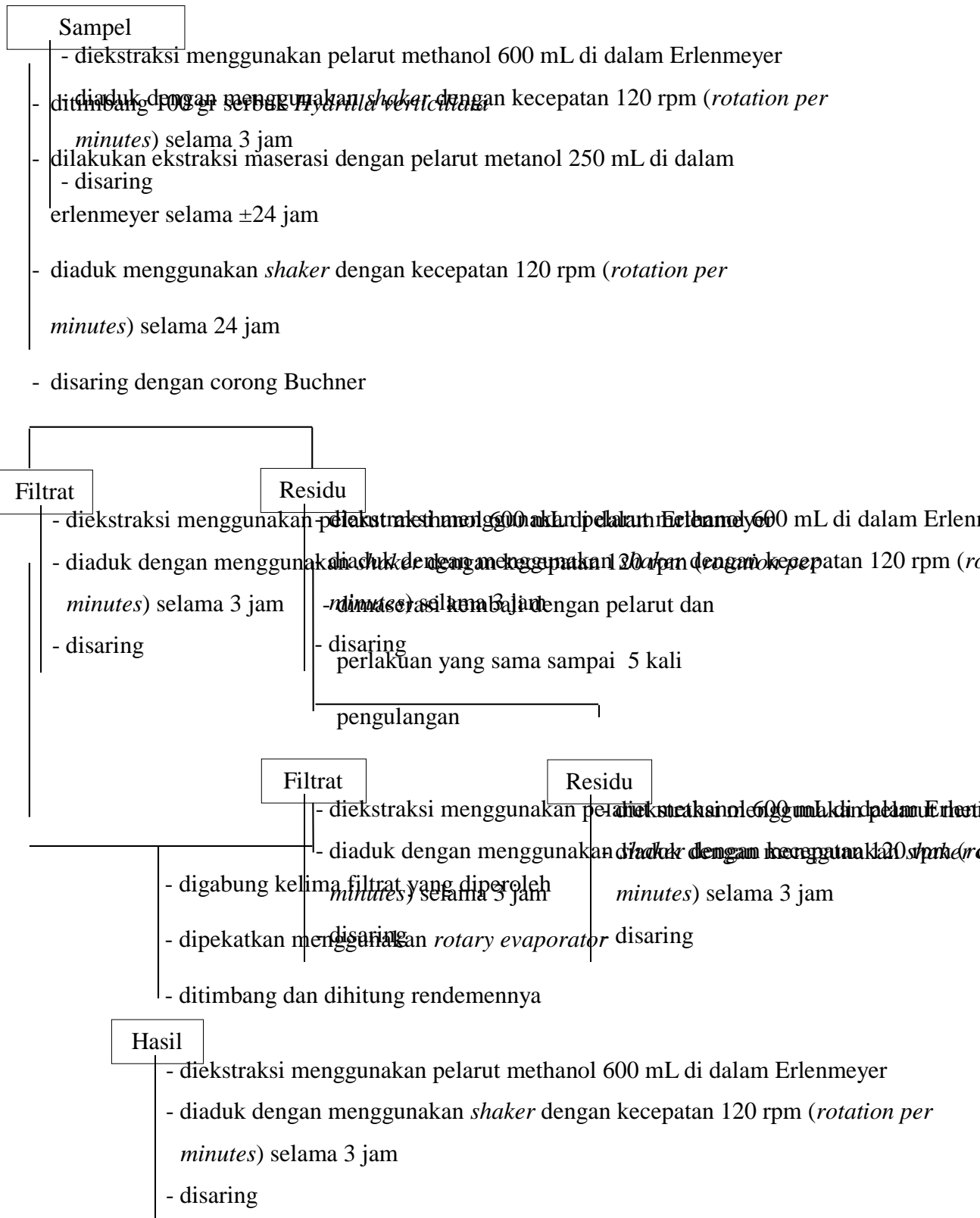
## 3. Analisis Kadar Air

Sampel
--------

- dimasukkan cawan porselen dalam oven pada suhu 100—105°C selama 15 menit
- didinginkan cawan dalam desikator selama 10 menit
- ditimbang
- dilakukan perlakuan yang sama hingga diperoleh berat cawan konstan
- dimasukkan 5 gram serbuk *Hydrilla verticillata* ke dalam cawan yang sudah diketahui berat konstan
- dimasukkan dalam oven pada suhu 100 — 105°C selama 15 menit
- didinginkan dalam desikator selama 10 menit
- ditimbang
- dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat konstan
- dihitung kadar air *H. verticillata*

Hasil
-------

#### 4. Ekstraksi Senyawa Aktif





## 5. Uji Fitokimia

### a. Identifikasi Flavonoid

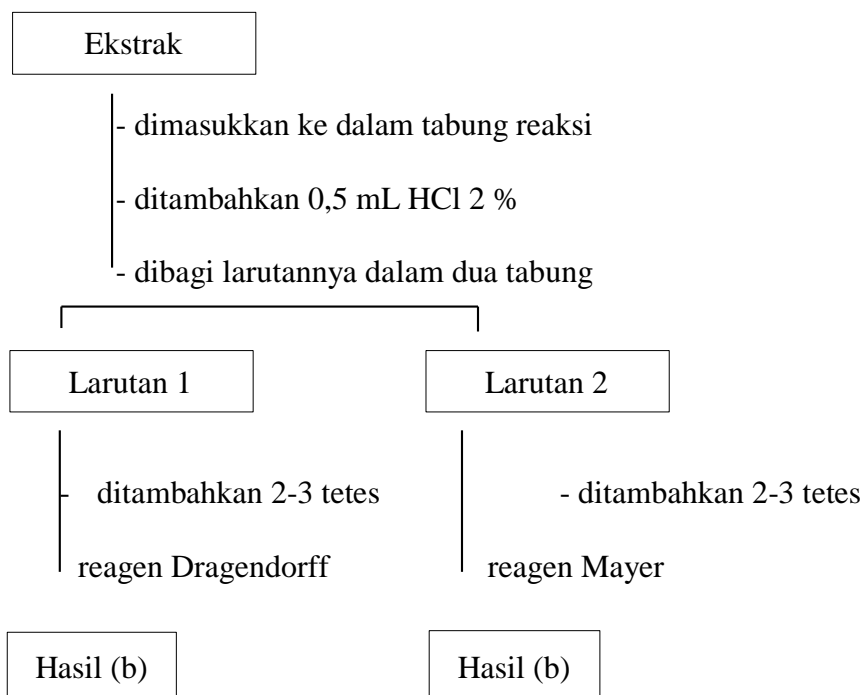
Ekstrak

- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambahkan 1-2 mL metanol panas 50%  
dan sedikit serbuk Mg
- ditambahkan 4-5 tetes HCl 37%

Hasil

**Ket:** Uji positif ditandai terbentuknya warna merah, kuning atau jingga

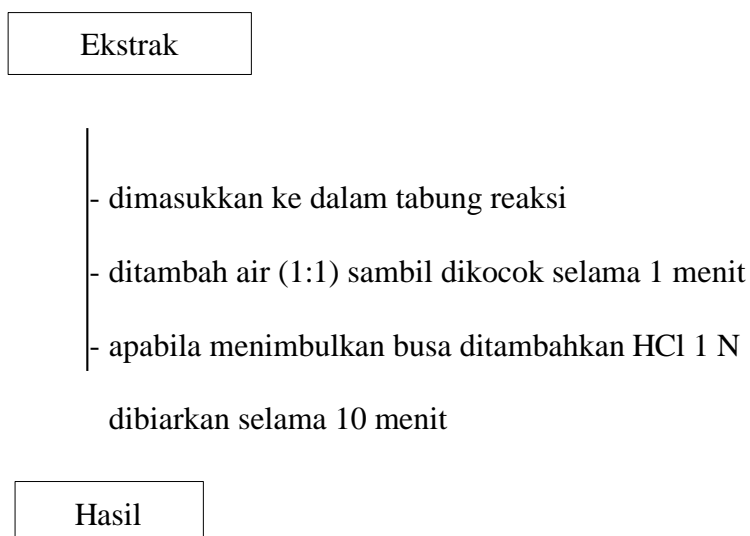
### b. Identifikasi Alaloid



**Ket:** Uji positif pada (a) ditandai terbentuknya endapan jingga

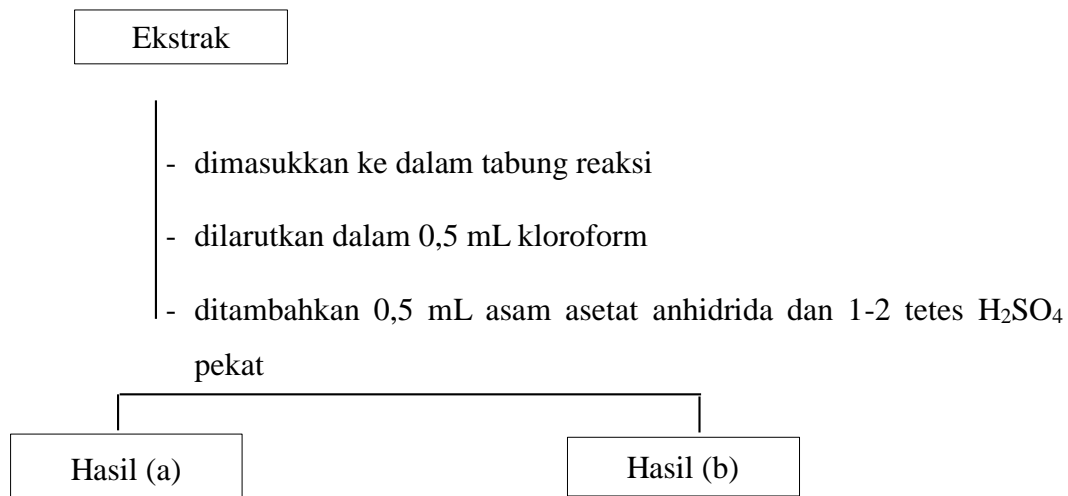
Uji positif pada (b) ditandai terbentuknya endapan kekuning-kuningan.

### c. Identifikasi Saponin



**Ket:** Uji positif ditandai terbentuknya warna coklat

**d. Identifikasi Triterpenoid dan Steroid**

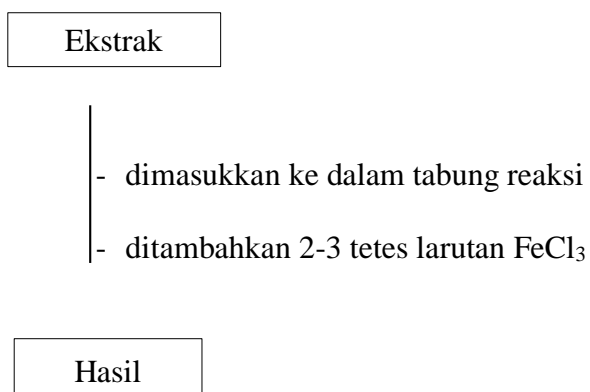


**Ket :** Pada (a) jika terbentuk warna coklat atau violet berbentuk cincin di perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpenoid

Pada (b) jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid

**e. Identifikasi Tanin**

**a. Uji dengan  $\text{FeCl}_3$**



**Ket:** Uji positif ditandai terbentuknya warna hijau kehitaman atau biru tinta

b. Uji dengan Gelatin

Ekstrak

- dimasukkan ekstrak ke dalam tabung reaksi
- ditambahkan larutan gelatin

Hasil

**Ket:** Uji positif ditandai terbentuknya endapan putih

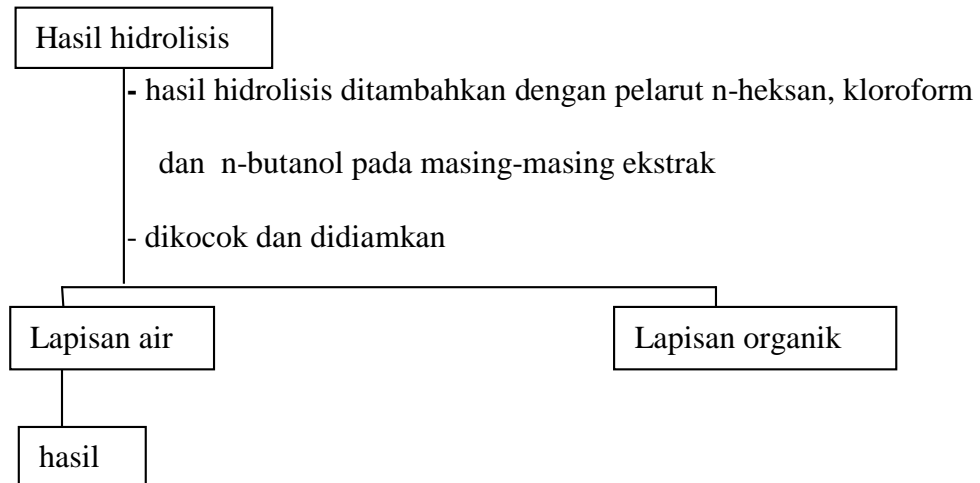
**6. Hidrolisis Ekstrak metanol hydrilla verticillata**

Ekstrak metanol

- 1,5 gram ekstrak pekat metanol
- Ditambahkan 3 mL HCl 2 N
- Distirer dengan hot plate selama 1 jam pada suhu ruang
- Dinetralkan pHnya dengan natrium bikarbonat

hasil

## 7. Partisi Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata*



-dipartisi kembali sampai 3 kali partisi

- Ekstrak hasil partisi dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator*. Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian ditimbang dan dihitung randemennya.

## 8. Uji Aktivitas Antioksidan

### a. Penentuan Absorbansi Kontrol

Larutan DPPH 0,2 mM

- diambil 1 mL
- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambahkan 3 mL etanol 95%
- diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit
- dimasukkan dalam kuvet
- dihitung absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis dengan  $\lambda_{\text{maks}}$  yang diketahui

Hasil

### b. Penentuan Absorbansi Masing-masing Sampel

Fraksi *H.verticillata* Konsentrasi 1,2,3,4,5 ppm

- diambil tiap konsentrasi sebanyak 3 mL
- ditambah 1 mL DPPH 0,2 mM
- diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit
- dihitung absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis dengan  $\lambda_{\text{maks}}$  yang diketahui
- dihitung presentase aktivitas antioksidannya

Hasil

## 9. Pembuatan Larutan

### 9.1 Pembuatan HCl 2 N

$$\text{BJ HCl pekat} = 1,19 \text{ g/mL}$$

$$\text{Konsentrasi} = 37\%$$

$$\text{BM HCl} = 36,42 \text{ g/mol}$$

$$\text{Caranya: } \frac{1,19 \text{ g}}{1 \text{ mL}} = \frac{100 \text{ g}}{x \text{ mL}}$$

$$X = \frac{100 \text{ g} \cdot 1 \text{ mL}}{1,19 \text{ g}}$$

$$= 84,0336 \text{ mL}$$

$$= 0,08430336 \text{ L}$$

$$\text{Mol} = \frac{g}{Mr}$$

$$= \frac{37}{36,42}$$

$$= 1,0159 \text{ mol}$$

$$\text{Molaritas} = \frac{\text{mol}}{V}$$

$$= \frac{1,0159 \text{ mol}}{0,084033 \text{ L}}$$

$$= 12,09 \text{ M}$$

$$\text{Normalitas} = M \times \text{valensi}$$

$$= 12,09 \times 1$$

$$= 12,09$$

$$N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$$

$$12,09 \text{ N} \cdot V_1 = 2 \text{ N} \cdot 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 16,54 \text{ mL}$$

Adapun prosedur pembuatannya adalah diambil larutan HCl 37% sebanyak 16,54 mL. dimasukkan kedalam labu takar 100 mL yang telah terisi akuades 15 mL. kemudian ditambahkan akuades hingga tanda batas dan dihomogenkan.

## 9.2 Larutan HCl 1 N

$$\text{BJ HCl pekat} = 1,19 \text{ g/mL}$$

$$\text{Konsentrasi} = 37 \%$$

$$\text{BM HCl} = 36,42 \text{ g/mol}$$

$$\text{Caranya: } \frac{1,19 \text{ g}}{1 \text{ mL}} = \frac{100 \text{ g}}{X \text{ mL}}$$

$$X = \frac{100 \text{ g} \cdot 1 \text{ mL}}{1,19 \text{ g}}$$

$$= 84,0336 \text{ mL}$$

$$= 0,0840336 \text{ L}$$

$$\text{mol} = \frac{\text{gr}}{\text{Mr}}$$

$$= \frac{37}{36,42}$$

$$= 1,0159 \text{ mol}$$

$$\text{Molaritas} = \frac{\text{mol}}{V}$$

$$= \frac{1,0159 \text{ mol}}{0,0840336 \text{ L}}$$

$$= 12,09 \text{ M}$$

$$\text{Normalitas} = M \times \text{valensi}$$

$$= 12,09 \times 1$$

$$= 12,09$$

$$N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$$



$$12,09 \text{ N} \cdot V_1 = 1 \text{ N} \cdot 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 8,3 \text{ mL}$$

Prosedur pembuatannya adalah diambil larutan HCl pekat 37% sebanyak 8,3 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL yang berisi 15 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

### 9.3 Pembuatan HCl 2%

$$\%_1 \times V_1 = \%_2 \times V_2$$

$$37\% \times V_1 = 2\% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

Prosedur pembuatannya adalah dipipet larutan HCl pekat 37% sebanyak 0,5 mL, kemudian dimasukkan dalam labu takar 10 mL yang berisi 5 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

### 9.4 Pembuatan Reagen Dragendorff

- Larutan I. 0,6 gr  $\text{Bi}(\text{NH}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dalam 2 mL HCl pekat dan 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$
- Larutan II. 6 gr KI dalam 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$

Cara pembuatannya adalah larutan I dibuat dengan 0,6 gr  $\text{Bi}(\text{NH}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  yang dilarutkan ke dalam 2 mL HCl pekat dan 10 mL aquades dan larutan II dibuat dengan 6 gr KI yang dilarutkan ke dalam 10 mL aquades. Kedua larutan tersebut dicampur dengan 7 mL HCl pekat dan 15 mL  $\text{H}_2\text{O}$  (Wagner, 2001).

### 9.5 Pembuatan Reagen MayerAA

- Larutan I. 1,358 gr  $\text{HgCl}_2$  dalam 60 mL  $\text{H}_2\text{O}$
- Larutan II. 5 gr KI dalam 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$

Cara pembuatannya adalah larutan I dibuat dengan 1,358 gr  $\text{HgCl}_2$  yang dilarutkan ke dalam 60 mL aquades dan larutan II dibuat dengan 5 gr KI yang dilarutkan ke dalam 10 mL aquades. Larutan I dituangkan ke dalam larutan II, diencerkan dengan aquades sampai tanda batas pada labu ukur 100 mL (Manan, 2006).

#### 9.6 Pembuatan reagen Liebermann-Burchard

- Asam sulfat pekat = 5 mL
- Asam asetat anhidrida = 5 mL
- Etanol absolut = 50 mL

Cara pembuatannya adalah asam sulfat pekat 5 mL dan asam asetat anhidrida 5 mL dicampur ke dalam etanol absolut 50 mL, kemudian didinginkan dalam lemari pendingin. penggunaan reagen ini digunakan langsung setelah pembuatan (Wagner, 2001).

#### 9.7 Pembuatan metanol 50% (v/v)

$$\%_1 \times V_1 = \%_2 \times V_2$$

$$99,8 \% \times V_1 = 50 \% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 5 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah diambil larutan metanol 99,8% sebanyak 5 mL kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang berisi  $\pm 5$  mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

#### 9.8 Pembuatan $\text{FeCl}_3$ 1% (b/v) dalam 100 mL

Besi (III) klorida ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan dilarutkan dengan aquades hingga tanda batas

### 9.9 Pembuatan $\text{NH}_3$ 10% (v/v)

$$\%_1 \times V_1 = \%_2 \times V_2$$

$$50 \% \times V_1 = 10 \% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 2 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah diambil larutan  $\text{NH}_3$  50% sebanyak 2 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang berisi  $\pm 5$  mL aquades. Ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

### 9.10 Pembuatan Larutan Gelatin

Cara pembuatannya adalah 2,5 g serbuk gelatin dicampur dengan 50 mL larutan garam NaCl jenuh, kemudian dipanaskan sampai gelatin larut seluruhnya. Setelah dingin, ditambah larutan garam NaCl jenuh dalam labu ukur 100 mL sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen (Sudarmaji, 2007).

### 9.11 Perhitungan Konsentrasi Larutan Ekstrak Untuk Uji Toksisitas

#### a. Pembuatan larutan stok 1000 ppm ekstrak hydrilla

$$\text{ppm} = \text{mg/L}$$

$$\text{larutan stok 1000 ppm} = \text{mg/L dalam 10 mL pelarutnya}$$

$$1000 \text{ ppm} = \frac{\text{mg}}{0,01 \text{ L}}$$

$$\text{mg} = 1000 \text{ mg/L} \cdot 0,01 \text{ L}$$

$$= 10 \text{ mg}$$

Jadi, larutan stok 1000 ppm pada masing-masing ekstrak dibuat dengan memasukkan 10 mg sampel ke dalam labu ukur 10 mL dan dilarutkan dengan pelarutnya sampai tanda batas.

#### b. Pembuatan larutan ekstrak 25 ppm

$$V_1 \times \text{ppm}_1 = V_2 \times \text{ppm}_2$$

$$V_1 \times 1000 \text{ ppm} = 0,01 \text{ L} \times 25 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,25 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 1000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,00025 \text{ L} = 0,25 \text{ mL} = 250 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 25 ppm dibuat dengan memipet 250  $\mu\text{L}$  larutan stok kemudian dilarutkan dalam 10 mL pelarutnya.

**c. Pembuatan larutan ekstrak 20 ppm**

$$V_1 \times \text{ppm}_1 = V_2 \times \text{ppm}_2$$

$$V_1 \times 1000 \text{ ppm} = 0,01 \text{ L} \times 20 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,2 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 1000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,0002 \text{ L} = 0,2 \text{ mL} = 200 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 20 ppm dibuat dengan memipet 200  $\mu\text{L}$  larutan stok kemudian dilarutkan dalam 10 mL pelarutnya.

**d. Pembuatan larutan ekstrak 15 ppm**

$$V_1 \times \text{ppm}_1 = V_2 \times \text{ppm}_2$$

$$V_1 \times 1000 \text{ ppm} = 0,01 \text{ L} \times 15 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,15 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 1000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,00015 \text{ L} = 0,15 \text{ mL} = 150 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 15 ppm dibuat dengan memipet 150  $\mu\text{L}$  larutan stok kemudian dilarutkan dalam 10 mL pelarutnya.

**e. Pembuatan larutan ekstrak 10 ppm**

$$V_1 \times \text{ppm}_1 = V_2 \times \text{ppm}_2$$

$$V_1 \times 1000 \text{ ppm} = 0,01 \text{ L} \times 10 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,1 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 1000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,0001 \text{ L} = 0,1 \text{ mL} = 100 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 10 ppm dibuat dengan memipet 100  $\mu\text{L}$  larutan stok kemudian dilarutkan dalam 10 mL pelarutnya.

**f. Pembuatan larutan ekstrak 5 ppm**

$$V_1 \times \text{ppm}_1 = V_2 \times \text{ppm}_2$$

$$V_1 \times 1000 \text{ ppm} = 0,01 \text{ L} \times 5 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,05 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 1000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,00005 \text{ L} = 0,05 \text{ mL} = 50 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 5 ppm dibuat dengan memipet 50  $\mu\text{L}$  larutan stok kemudian dilarutkan dalam 10 mL pelarutnya.

## 10. Data pengamatan dan perhitungan

### 10.1 Data Pengukuran Kadar Air

Ulangan	Berat Cawan Kosong						Berat
Cawan	Sebelum	P1	P2	P3	P4	P5	Konstan
	Dioven						(g)
A1	43,23	43,23	43,23	43,23	43,23	43,23	43,23
A2	55,76	55,76	55,76	55,76	55,76	55,76	55,76

Ulangan	Berat Cawan + Sampel						Berat
Cawan	Sebelum	P1	P2	P3	P4	P5	Konstan
	Dioven						(g)
A1	48,23	47,77	47,75	47,74	47,74	47,74	47,748
A2	60,76	60,318	60,298	60,298	60,298	60,298	60,302

#### a. Kadar air ulangan ke-1

Kadar air ..... =

$$\frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{\text{berat sampel}} \times 100 \%$$

$$= \frac{(48,23-47,748) \text{ g}}{5 \text{ g}} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,482 \text{ g}}{5 \text{ g}} \times 100 \%$$

$$= 9,64 \%$$

#### b. Kadar air ulangan ke-2

Kadar air ..... =

$$\frac{(berat\ cawan+sampel\ sebelum\ dioven)-(berat\ cawan+sampel\ setelah\ dioven)}{berat\ sampel} \times 100 \%$$

$$= \frac{(60,76-60,302)\ g}{5\ g} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,458\ g}{5\ g} \times 100 \%$$

$$= 9,16 \%$$

Kadar air kering rata-rata pada sampel *Hydrilla verticillata* adalah: 9,4 %

## 10.2 perhitungan rendemen dan data

### a. Ekstrak Metanol

Berat sampel (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + ekstrak pekat (g)	Berat ekstrak pekat (g)
100 g	161,7 g	168,2 g	6,5 g

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \%$$

$$= \frac{6,5\ g}{100\ g} \times 100 \%$$

$$= 6,5 \%$$

### b. Hasil partisi

#### ➤ Partisi fraksi n-Heksana

Berat sampel (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + ekstrak pekat (g)	Berat ekstrak pekat (g)

1,5 g	106,98 g	108,34 g	1,36 g
-------	----------	----------	--------

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\
 &= \frac{1,36 \text{ g}}{1,5 \text{ g}} \times 100 \% \\
 &= 90,66 \%
 \end{aligned}$$

➤ **Partisi fraksi kloroform**

<b>Berat sampel (g)</b>	<b>Berat wadah (g)</b>	<b>Berat wadah + ekstrak pekat (g)</b>	<b>Berat ekstrak pekat (g)</b>
1,5 g	101,26 g	101,87 g	0,61 g

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,61 \text{ g}}{1,5 \text{ g}} \times 100 \% \\
 &= 40,66 \%
 \end{aligned}$$

➤ **Partisi fraksi n-Butanol**

<b>Berat sampel (g)</b>	<b>Berat wadah (g)</b>	<b>Berat wadah + ekstrak pekat (g)</b>	<b>Berat ekstrak pekat (g)</b>
1,5 g	109,75 g	110,81 g	1,14 g

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \%$$



$$= \frac{1,14 \text{ g}}{1,5 \text{ g}} \times 100 \%$$

$$= 76 \%$$

## 11. Nilai EC<sub>50</sub>

### Fraksi n-Butanol

Comparison of Fits

Can't calculate

Different curve for each data

Null hypothesis

set

Alternative hypothesis

One curve for all data sets

P value

Conclusion (alpha = 0.05)

Models have the same DF

Different curve for each data

Preferred model

set

F (DFn, DFd)

Different curve for each data

set

Best-fit values

LogEC<sub>50</sub> 2,708

HillSlope 0,3171

EC<sub>50</sub> 510,2

Std. Error

LogEC<sub>50</sub> 1,518

HillSlope 0,2143

95% CI (profile likelihood)

LogEC50 1,103 to ???

HillSlope -0,33 to 1,213

EC50 12,69 to ???

Goodness of Fit

Degrees of Freedom 3

R square 0,4326

Absolute Sum of Squares 33,29

Sy.x 3,331

One curve for all data sets

Best-fit values

LogEC50 2,708 2,708

HillSlope 0,3171 0,3171

EC50 510,2 510,2

Std. Error

LogEC50 1,518 1,518

HillSlope 0,2143 0,2143

95% CI (profile likelihood)

LogEC50 1,103 to ??? 1,103 to ???

HillSlope -0,33 to 1,213 -0,33 to 1,213

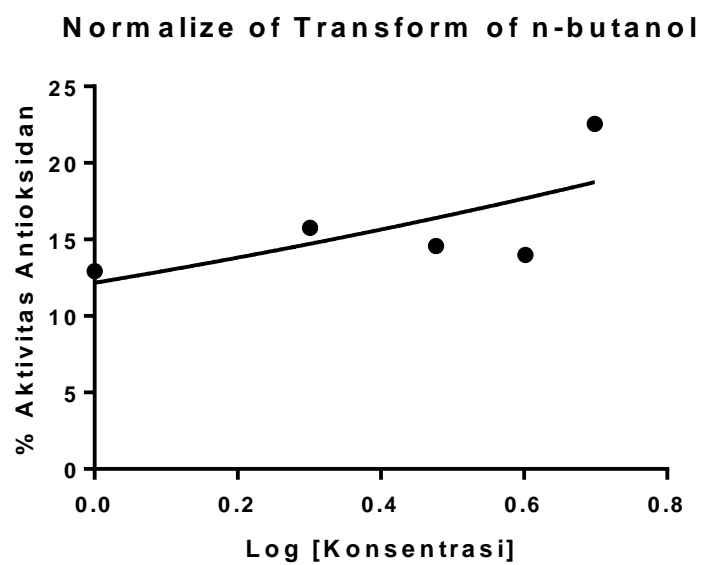
EC50 12,69 to ??? 12,69 to ???

Goodness of Fit

Degrees of Freedom 3

R square 0,4326 0,4326

Absolute Sum of Squares	33,29	33,29
Sy.x		3,331
Constraints		
LogEC50	LogEC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points		
# of X values	5	
# Y values analyzed	5	

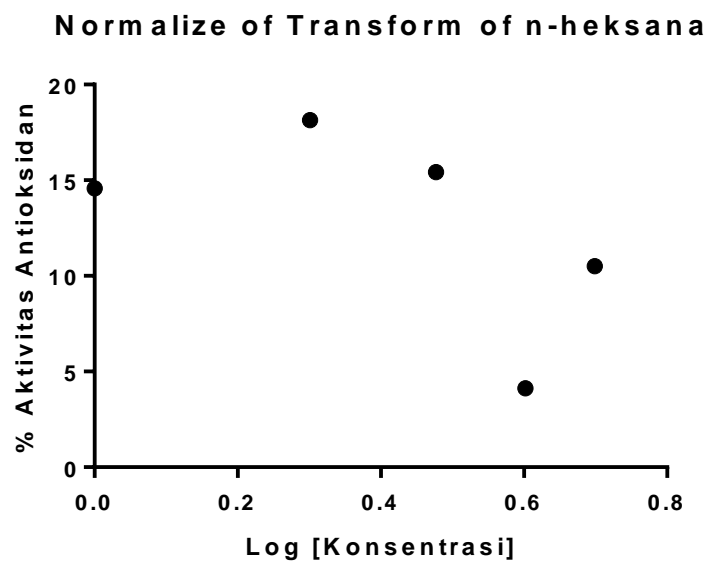


### Fraksi n-Heksana

Comparison of Fits	Can't calculate
	Different curve for each data
Null hypothesis	set

Alternative hypothesis	One curve for all data sets
P value	
Conclusion ( $\alpha = 0.05$ )	Neither fit completed
Preferred model	
F (DFn, DFd)	
Different curve for each data set	
set	Not converged
Best-fit values	
LogEC50	
HillSlope	
EC50	
Std. Error	
LogEC50	
HillSlope	
95% CI (profile likelihood)	
LogEC50	
HillSlope	
EC50	
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	
R square	
Absolute Sum of Squares	
Sy.x	

One curve for all data sets	Not converged
Best-fit values	
LogEC50	
HillSlope	
EC50	
Std. Error	
LogEC50	
HillSlope	
95% CI (profile likelihood)	
LogEC50	
HillSlope	
EC50	
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	
R square	
Absolute Sum of Squares	
Sy.x	
Constraints	
LogEC50	LogEC50 is shared
HillSlope	HillSlope is shared
Number of points	
# of X values	5
# Y values analyzed	5



### Fraksi Kloroform

Comparison of Fits

Can't calculate

Null hypothesis

Different curve for each data set

Alternative hypothesis

One curve for all data sets

P value

Conclusion ( $\alpha = 0.05$ )

Models have the same DF

Preferred model

Different curve for each data set

F (DFn, DFd)

Different curve for each data set

Best-fit values

LogEC50

-5,38

HillSlope

-0,162

EC50

4,172e-006

Std. Error

LogEC50	1,665	
HillSlope	0,04679	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	-106,4 to -2,622	
HillSlope	-0,3117 to -0,008777	
EC50	0 to 0,002387	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	3	
R square	0,7902	
Absolute Sum of Squares	0,9836	
Sy.x	0,5726	
One curve for all data sets		
Best-fit values		
LogEC50	-5,38	-5,38
HillSlope	-0,162	-0,162
EC50	4,172e-006	4,172e-006
Std. Error		
LogEC50	1,665	1,665
HillSlope	0,04679	0,04679
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	-106,4 to -2,622	-106,4 to -2,622
HillSlope	-0,3117 to -0,008777	-0,3117 to -0,008777
EC50	0 to 0,002387	0 to 0,002387

Goodness of Fit

Degrees of Freedom

3

R square

0,7902

0,7902

Absolute Sum of Squares

0,9836

0,9836

Sy.x

0,5726

Constraints

LogEC50

LogEC50 is shared

HillSlope

HillSlope is shared

Number of points

# of X values

5

# Y values analyzed

5

